

Analyse und Steuerung des Retentionsverhaltens verschiedener Modellanalyte in mikrostrukturierten Papieren



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation
vorgelegt von
Sonja Wendenburg, M.Sc.
aus Dieburg

Referent:	Prof. Dr. Markus Biesalski
Korreferent:	Prof. Dr. Katja Schmitz
Tag der Einreichung:	27. November 2017
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Januar 2018

Darmstadt 2018

Wendenburg, Sonja: Analyse und Steuerung des Retentionsverhaltens verschiedener
Modellanalyte in mikrostrukturierten Papieren
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
2018
Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2018

Veröffentlicht unter CC BY-NC-ND 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

Die vorliegende Arbeit wurde am Ernst-Berl-Institut für Technische Chemie und Makromolekulare Chemie der Technischen Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Biesalski in der Zeit vom 01. Juni 2013 bis 31. Dezember 2016 durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder auf Tagungen präsentiert:

Veröffentlichungen

S. Wendenburg, M.-L. Nachbar, M. Biesalski: "Tailoring the Retention of Charged Model Compounds in Polymer Functionalized Paper-Based Microfluidic Devices", *Macromol. Chem. Phys.*, 218:1600408, **2017**.

S. Bump, A. Böhm, L. Babel, S. Wendenburg, F. Carstens, S. Schabel, M. Biesalski, T. Meckel: "Spatial, Spectral, Radiometric, and Temporal Analysis of Polymer-Modified Paper Substrates Using Fluorescence Microscopy", *Cellulose*, 22:73–8, **2015**.

S. Wendenburg: "Intelligent Filter Devices on Paper", *Cellulose Materials Doctoral Students Summer Conference*, Science and Technology, Aalto University, ISBN 978-952-60-5817-7, **2014**.

Poster: S. Wendenburg, A. Böhm, M. Biesalski: "Design and Understanding of Microfluidic Paper Devices", *Makromolekulares Kolloquium*, **24. – 26. Februar 2016**, Freiburg, Deutschland.

Poster: S. Wendenburg, A. Böhm, M. Biesalski: "Microfluidic Papers as Low-Cost Intelligent Filters", *International Congress on Materials Science and Engineering (MSE 2014)*, **23. – 25. September 2014**, Darmstadt, Deutschland

Vorträge

S. Wendenburg, M. Biesalski: "Understanding & Designing the Retention of Model Compounds in Microfluidic Paper Devices", *251st American Chemical Society National Meeting and Exposition (ACS 2016)*, **13. – 17. März 2016**, San Diego, USA.

Danksagung

Viele Menschen haben mich bei meiner Arbeit in den letzten Jahren auf verschiedenste Weise unterstützt. Bei allen möchte ich mich an dieser Stelle aufrichtig bedanken! Einige möchte ich besonders erwähnen.

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Biesalski für seine Unterstützung bei meiner Arbeit über den gesamten Promotionszeitraum bedanken. Durch die Begleitung bei immer neuen herausfordernden Aufgaben gabst du mir die Möglichkeit mich kontinuierlich weiter zu entwickeln. Vielen Dank dafür!

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Katja Schmitz für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Retention von IL-8 in mikrostrukturieren Papieren und für die Übernahme des Korreferats bedanken. Auch Kevin Brahm danke ich für die angenehme Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projekts.

Vielen Dank an die Fachprüfer Prof. Dr. Christian Hess und Jun.Prof. Dr. Anette Andrieu-Brunsen für die unkomplizierte Zusage.

Ein besonderer Dank geht an Dipl.-Ing. Karl Kopp aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hess für die XPS-Messungen und an das Fachgebiet für Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik (PMV) unter Prof. Dr. Samuel Schabel. Hier möchte ich vor allem Dipl.-Ing. Franz Carstens für die Bereitstellung des Zellstoffs sowie viele fachliche Anregungen zum Thema Papier danken.

Ich möchte mich beim allen Mitgliedern der Arbeitskreise Biesalski und Andrieu-Brunsen für die vielfältige Unterstützung, die offenen Ohren und zahlreichen Hinweise, die gemeinsamen Abende und die Zeit auf Konferenzen, Messen und AK Seminaren bedanken! Jeder von euch hat einen Teil dazu beigetragen, dass diese Arbeit entstehen konnte. Vielen, vielen Dank dafür!

Ein besonderer Dank geht auch an David Punal Gamboa, Maximilian Nau, Michelle-Lisa Nachbar, Stefan Prosch, Ursula Bärbel Menges, Markus Olschewski und Christian Benner, die mich mit Ihrer Arbeit im Rahmen Ihrer Vertiefungspraktika bzw. Bachelorthesen unterstützt haben.

Vielen Dank auch an alle Arbeitskollegen, Freunde und Familienmitglieder die sich in der letzten Zeit intensiv mit der Korrektur dieser Arbeit beschäftigt haben.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für ihre stete moralische und finanzielle Unterstützung danken, die ich meine gesamte Studien- und Promotionszeit genießen durfte und ohne die ich nicht so weit gekommen wäre!

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Mikrostrukturierung von Papiersubstraten	4
1.2.	Sekundäre Fluidtransportsteuerungstechniken	9
1.3.	Detektieren und Auslesen	12
1.4.	Aktuelle Anwendung und derzeitige Grenzen für μ PADs	16
2.	Motivation, Zielsetzung und Strategien der Dissertation	19
2.1.	Motivation	19
2.2.	Zielsetzung	19
2.3.	Strategie	20
3.	Methoden und theoretische Grundlagen	23
3.1.	Von Cellulose zu Papier	23
3.1.1.	Aufbau und Eigenschaften von Cellulose(fasern)	23
3.1.2.	Gewinnung und spezifische Eigenschaften von Baumwolllinters- und Eukalyptussulfatfasern	27
3.1.3.	Papier	29
3.1.4.	Fluidtransport in Papieren	32
3.2.	Adsorption gelöster Stoffe auf festen Oberflächen	34
3.2.1.	Chromatographische Auftrennung gelöster Stoffgemische	35
3.2.2.	Von der Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen mit Cellulose(fasern)	37
3.2.3.	Adsorption von Proteinen an Oberflächen	41
3.2.4.	Interleukin-8 (IL-8)	44
3.3.	Methodenentwicklung: Durchführung und Auswertung von Retentionsexperimenten	46
3.3.1.	Horizontales System	46
3.3.2.	Vertikales System	52
4.	Charakterisierung des verwendeten Substratmaterials Papier	55
4.1.	Chemische Beschaffenheit der Fasern	55
4.1.1.	Elementaranalyse	55
4.1.2.	FTIR-Analyse	56
4.2.	Faserbeschaffenheit	58
4.3.	Ladungscharakteristika der Fasern (Zetapotentialmessung)	59
4.4.	Struktur der verwendeten Papiere	62
4.4.1.	Papierdichte	62
4.4.2.	Quecksilberporosimetrie	64
4.5.	Fazit	67
5.	Analyse des Retentionsverhaltens von Modellfarbstoffen in Papier	69
5.1.	Chemische Struktur der Farbstoffe in Abhängigkeit des pH-Werts	69
5.1.1.	Negativ geladener Modellfarbstoff: Tartrazin	69
5.1.2.	Positiv geladener Modellfarbstoff: Methylenblau	71
5.2.	Retentionsverhalten in Abhängigkeit von der fluiden Phase	75

5.2.1.	Einfluss des pH-Werts auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau	75
5.2.2.	Einfluss der elektrischen Leitfähigkeit auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau	81
5.2.3.	Einfluss der Farbstoffkonzentration auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau	88
5.3.	Retentionsverhalten von Tartrazin und Methylenblau in Abhängigkeit des Substrats	91
5.3.1.	Einfluss der Papierdichte auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau	92
5.3.2.	Einfluss des Papiertyps auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau	95
5.4.	Fazit	98
6.	Gezielte, ortsspezifische Retention der Modellkomponente Tartrazin in mikrostrukturiertem Papier	101
6.1.	Generierung positiver Ladungen durch polymeranaloge Umsetzung (PU)	101
6.1.1.	Polymeranaloge Umsetzung (PU) in Lösung	102
6.1.2.	Polymeranaloge Umsetzung auf Papiersubstraten	107
6.2.	<i>Proof-of-Concept</i> -Experiment für die gezielte, ortsspezifische Retention von Tartrazin in Papier	114
6.3.	Aufkonzentration von Tartrazin in μ PADs	117
6.4.	Fazit	119
7.	Analyse des Retentionsverhaltens des Modellproteins IL-8-TAMRA in Papier	121
7.1.	5(6)-Carboxytetramethylrhodamin-markiertes Interleukin-8 (IL-8-TAMRA) als Modellprotein	121
7.2.	Retentionsverhalten in Abhängigkeit von der fluiden Phase	123
7.2.1.	Wasserbasierte Fluide: Einfluss des pH-Werts	123
7.2.2.	Wasserbasierte Fluide: Einfluss der Pufferart	125
7.2.3.	Wasserbasierte Fluide: Einfluss der Proteinkonzentration	127
7.2.4.	Lösungsmittelbasierte Fluide	130
7.3.	Retentionsverhalten in Abhängigkeit von Substratmodifikationen	132
7.3.1.	Modifikation der Substratoberfläche mit P(DMAA-co-MABP)	132
7.3.2.	Modifikation der Substratoberfläche mit BSA	134
7.4.	Fazit	135
8.	Zusammenfassung und Ausblick	137
9.	Experimenteller Teil	141
9.1.	Verwendete Reagenzien, Lösungsmittel und Materialien	141
9.2.	Verwendete Geräte und Software	142
9.3.	Monomer- und Polymersynthese	145
9.3.1.	Synthese von 4-Methacryloyloxybenzophenon (MABP) nach Freidank ^[25] & Berchtold ^[177]	145
9.3.2.	Synthese von <i>N</i> -Methacryloyl- β -alaninsuccinimidester (MAC ₂ AE) nach Murata <i>et al.</i> ^[178]	146
9.3.3.	Synthese von P(S-co-MABP-co-PyMA) nach Böhm <i>et al.</i> ^[23]	147
9.3.4.	Synthese von P(DMAA-co-MAC ₂ AE-co-MABP-co-PyMA) nach Böhm ^[24]	148

9.3.5.	Polymeranaloge Umsetzung von P(DMAA-co-MAC ₂ AE-co-MABP-co-PyMA) in Lösung	149
9.3.6.	Synthese von P(DMAA-co-MABP)	150
9.4.	Papierherstellung und Charakterisierung	151
9.4.1.	Ausgangsmaterial	151
9.4.2.	Faserbeschaffenheit	151
9.4.3.	Zetapotentialmessungen	152
9.4.4.	Papierdichte	154
9.4.5.	Quecksilberporosimetrie	155
9.5.	Mikrostrukturierung von Papiersubstraten	156
9.5.1.	Herstellung von mikrostrukturierten Papiersubstraten	156
9.5.2.	Implementierung von "Patches" in mikrostrukturierten Papiersubstraten	157
9.5.3.	Modifikation von Patches	158
9.6.	Retentionsexperimente der Farbstoffe	158
9.6.1.	Chemische Struktur der Farbstoffe in Abhängigkeit des pH-Werts	158
9.6.2.	Einfluss des pH-Werts	159
9.6.3.	Einfluss der Leitfähigkeit	161
9.6.4.	Einfluss der Analytkonzentration	163
9.6.5.	Einfluss der Papierdichte	164
9.6.6.	Einfluss des Papiertyps	166
9.7.	Experimente zur gezielten, ortsspezifischen Retention der Modellkomponente Tartrazin in mikrostrukturiertem Papier	167
9.7.1.	Polymeranaloge Umsetzung (PU) von P(DMAA-co-MAC ₂ AE-co-MABP-co-PyMA) auf Papiersubstraten	167
9.7.2.	Negativkontrolle zur Anbindung von AEMAC	168
9.7.3.	<i>Proof-of-concept</i> -Experiment für die gezielte, ortsspezifische Retention von Tartrazin in Papier	172
9.7.4.	Aufkonzentration von Tartrazin in μ PADs	172
9.8.	Retentionsexperimente der Proteine	174
9.8.1.	Einfluss des pH-Werts	174
9.8.2.	Wasserbasierte Fluide: Fluoreszierende Fluidfront	176
9.8.3.	Einfluss der Leitfähigkeit	176
9.8.4.	Einfluss der Pufferart	180
9.8.5.	Einfluss der Analytkonzentration	182
9.8.6.	Untersuchungen zu lösungsmittelbasierten Fluiden	184
9.8.7.	Einfluss der Modifikation der Substratoberfläche mit P(DMAA-co-MABP)	185
9.8.8.	Einfluss der Modifikation der Substratoberfläche mit Rinderserumalbumin (BSA)	186
	Abkürzungsverzeichnis	187
	Literaturverzeichnis	191
	Summary and Outlook	199
	Anhang	203

1. Einleitung

"What is microfluidics? It is the science and technology of systems that process or manipulate small (10^{-9} to 10^{-18} liters) amounts of fluids, using channels with dimensions of ten to hundreds of micrometers." (Whitesides, 2006)^[1]

Herkömmliche mikrofluidische Systeme wurden vor allem seit Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts, die auch als "Renaissance der Mikrofluidik" bezeichnet werden, intensiv beforscht.^[2] Die geringe Größe der Systeme und daraus resultierend ein geringes Proben- und Reagenzienvolumen sowie schnellere Ergebnisse im Vergleich zu herkömmlichen Laboruntersuchungen versprachen Vorteile in den Bereichen Analytik und Diagnostik.^[1, 3] Dennoch fanden die klassischen mikrofluidischen Systeme der ersten und zweiten Generation auf Basis von Silizium und Glas bzw. Polydimethylsiloxan (PDMS) kaum kommerzielle Anwendung.^[2-3] Hauptsächlich dafür verantwortlich, dass diese vielversprechenden Systeme die Universitäten und Forschungseinrichtungen nie verließen, schienen die hohen Produktionskosten sowie die zusätzlich benötigten Pumpen zum geregelten Transport der Fluide im System.^[3] Um die Vorteile der Mikrofluidik dennoch kommerziell nutzbar zu machen, musste nach besser geeigneten Substratmaterialien gesucht werden. Dabei gerieten faservliesartige Materialien wie Nitrocellulosemembranen oder Papier, in denen der Fluidtransport kapillarkraftgetrieben erfolgt, in den Fokus. Diese Materialien versprechen eine simple Handhabung aufgrund ihres intrinsischen Fluidtransports.^[3]

Dipstick und Lateral Flow Schnelltests

Dipstick und *Lateral Flow* Schnelltests finden bereits seit Mitte des letzten Jahrhunderts auch kommerziell eine Vielzahl von Anwendungen.^[4] Ursprünglich entwickelt auf dem Gebiet der klinischen Diagnostik, werden diese Technologien mittlerweile auch in den Bereichen der Tiermedizin, Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit oder Umweltüberwachung angewendet.^[5] Aufgrund ihrer simplen und schnellen Handhabung, ihrer Stabilität auch ohne Kühlung und ihrer meist geringen Kosten sind sie besonders geeignet für Heimanwendung (z.B. Schwangerschaftstests). Auch in infrastrukturell schwachen Regionen der Entwicklungsländer, wo aufgrund fehlenden Personals und fehlender Infrastruktur oft keine Laboranalysen möglich sind, finden sie häufig Anwendung. Hier werden sie meist als "*point-of-care*" Schnelltests bezeichnet. Diagnostik ist der erste Schritt zu einer erfolgreichen Behandlung von Erkrankten. Die Untersuchung von Lebensmitteln und Wasser auf krankmachende Erreger kann Vergiftungen und Pandemien verhindern. Tiermedizinische und landwirtschaftliche Untersuchungen können Risikofaktoren der öffentlichen Gesundheit (z.B. BSE oder SARS) erkennen und eindämmen helfen. Folglich können Schnelltests einen wichtigen Beitrag zu einer besseren Gesundheit und Lebensqualität vor allem in Entwicklungsländern leisten, indem sie schnell und einfach qualitative Antworten liefern.^[4-5]

Ein *Dipstick* Schnelltest (Abbildung 1) besteht aus einem Träger auf den getrocknete Analyte in verschiedenen *Fleece*-Bereichen aufgebracht sind. Durch das Eintauchen des Teststreifens in die zu analysierende Flüssigkeit wird diese passiv in die reaktiven Bereiche transportiert. Dort werden getrocknete Analyte gelöst und reagieren, um das Testergebnis meist kolorimetrisch anzuzeigen. Klassisch werden diese Tests beispielsweise zur Detektion des Glucose- oder Proteingehalts in Urin oder des pH-Wertes beliebiger Flüssigkeiten verwendet.^[6]



Abbildung 1: Fotografie eines *Dipstick* Schnelltests zur kolorimetrischen Bestimmung des pH-Werts einer Lösung.

Lateral Flow Schnelltests besitzen mehrere Bereiche, bestehend aus verschiedenen, aufgabenangepassten Materialien, die miteinander überlappend in einem Gehäuse ("Housing") zum Schutz vor äußeren Einflüssen eingebaut sind (Abbildung 2). Am *sample port* wird eine zu analysierende Probe aufgetragen und im *sample pad* aufgenommen. Dieses, aus einem saugfähigen Material wie Baumwolllinters, Glasfaser oder Viskose bestehende Element, bereitet die Probe für den Test vor und transportiert sie weiter zum *conjugate pad*. Hier sind Immunkonjugate wie z.B. kolloidales Gold adsorbiert. Sobald die Probe diesen Bereich aus Glasfasern, Polyester oder Viskose erreicht, lösen sich die Partikel und konjugieren ggf. abhängig von der Testart (Abbildung 3) mit den zu detektierenden Analyten der Probe. Sie erreichen so den Bereich der *reaction matrix*. In dieser häufig aus Nitrocellulose bestehenden, porösen Membran befinden sich *test-* und *control line*. In den bandenförmigen Bereichen sind Antikörper oder Antigene immobilisiert. Diese wechselwirken selektiv mit den zu detektierenden Partikeln und zeigen so, abhängig von der Art des Tests und der Kombination aus sichtbaren Linien, ein positives oder negatives Testergebnis an (Abbildung 3). Überschüssiges Probenmaterial wird anschließend im *absorbent pad* meist aus reiner Cellulose aufgefangen.

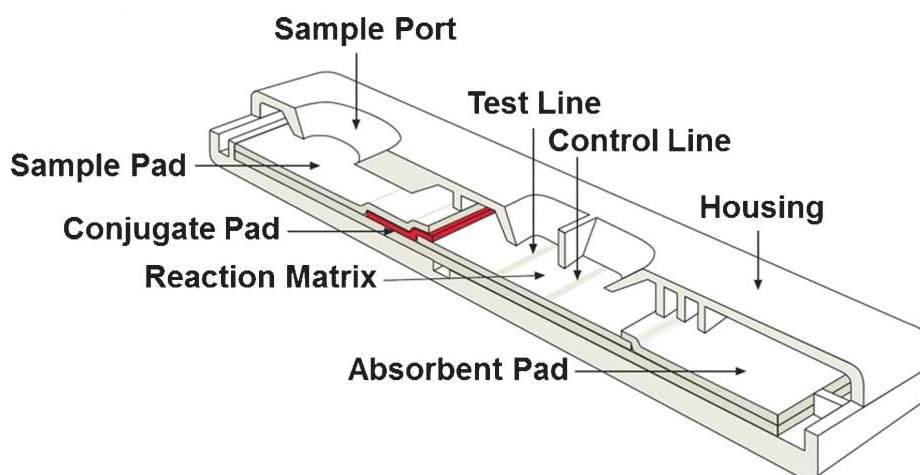
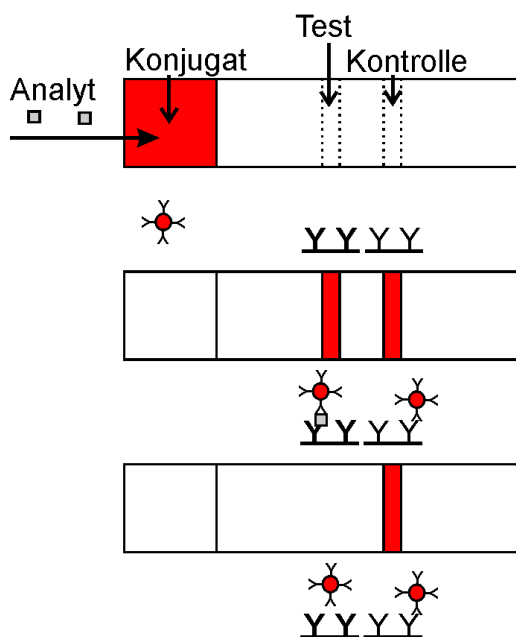


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines typischen *Lateral Flow* Schnelltests. Nach Auftragung der Probe am *sample port* wird diese im *sample pad* aufgenommen und für den Test vorbereitet. Weitertransportiert in den *conjugate pad* löst die Probe die Immunkonjugate, die mit den Analyten konjugieren. In der *reaction matrix* binden Immunkonjugate bzw. Analyt an *test-* bzw. *control line*, bevor die Probe im *absorbent pad* gesammelt wird. Mit freundlicher Genehmigung der Merck Millipore Corporation.^[7]

Bei Direkttests bedeuten zwei Linien ein positives Ergebnis, da neben der Wechselwirkung der Immunkonjugate mit Antikörpern der Kontrolllinie auch analytvermittelte Wechselwirkungen der Immunkonjugate mit den Antikörpern der Testlinie möglich sind. Wird ausschließlich die Kontrolllinie sichtbar, ist das Ergebnis negativ.

In kompetitiven Tests dagegen bedeuten zwei Linien ein negatives Ergebnis, denn das Konjugat kann ohne Analytvermittlung an die Antikörper in beiden Linien binden. Wird allerdings die Wechselwirkung mit den Antikörpern der Testlinie durch in der Probe enthaltene Analyte unterbunden, kann keine Wechselwirkung der Immunkonjugate mit den Antikörpern der Testlinie erfolgen, die Testlinie wird nicht sichtbar. ^[4-5, 8]

Direkttest



kompetitiver Test

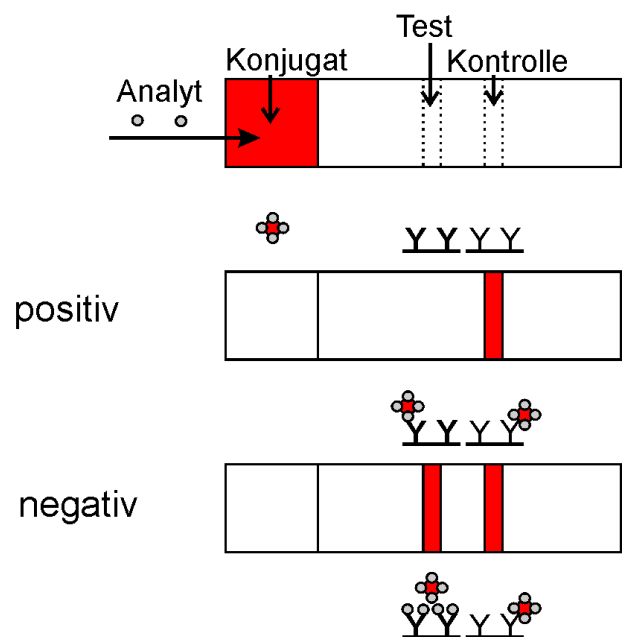


Abbildung 3: Wechselwirkung der Immunkonjugate mit den Antikörpern der Test- bzw. Kontrolllinie abhängig von der Testart: Links: Direkttest; Rechts: kompetitiver Test (nach O'Farell *et al.*^[5]).

Kapillarkraftgetriebene Schnelltests sind meist kostengünstig in der Herstellung, einfach zu transportieren und bedürfen kaum Vorbereitung der Proben.^[4] Begrenzt effizient sind sie allerdings dadurch, dass sie keine komplexen Analyseschritte zulassen, meist nur qualitative Aussagen liefern und häufig eine relativ hohe Detektionsgrenze aufweisen.^[3] Um diese und weitere Grenzen kommerzieller, mikrofluidischer Systeme zu überwinden, wenden sich immer mehr Wissenschaftler Papier als alternatives Substratmaterial zu.^[4, 8-9]

Papier statt Nitrocellulose

Das bereits vor etwa 2000 Jahren in China erfundene Material Papier diente Jahrhunderte lang ausschließlich als Informationsträger und Kommunikationsmittel. Mit der Industriellen Revolution im 19. Jahrhundert kamen weitere Anwendungen als Verpackungs- oder Hygienematerial hinzu.^[10] In jüngster Vergangenheit geriet Papier als Substrat für mikrofluidische papierbasierte Analytiksysteme (" μ PAD" - *microfluidic Paper-based Analytical Device*^[11]), als Weiterentwicklung der klassischen *Lateral Flow Tests*, in den Fokus der Wissenschaft.^[12] Das Fasernetzwerk zufällig angeordneter, verwobener Cellulosefasern bietet als Substratmaterial für μ PADs einige Vorteile

gegenüber Nitrocellulose. Zwar ist in beiden Materialien ein kapillarkraftgetriebener Fluidtransport, der in Nitrocellulose aufgrund besser definierter Poren sogar stabiler und reproduzierbarer ist, möglich, allerdings setzt das bei intrinsisch hydrophober Nitrocellulose eine Behandlung mit Benetzungsmitteln voraus. Eine ungewollte Wechselwirkung der Benetzungsmittel mit zu untersuchenden Analyten muss daher im Vorfeld ausgeschlossen werden. Papier hingegen ist intrinsisch hydrophil und bedarf keiner weiteren Behandlung für einen kapillarkraftgetriebenen Fluidtransport.^[5-6] Sowohl Nitrocellulose als auch Papier zeichnen sich dadurch aus, dass sie dünn, leicht und somit einfach zu transportieren sind.^[4, 6, 13] Während Nitrocellulose brüchig, entzündlich und unbeständig gegenüber erhöhten Temperaturen (100 °C)^[12] ist, ist das flexible Material Papier resistent gegen eine Vielzahl von Chemikalien und weist nahezu keine thermische Ausdehnung auf.^[6, 12-14] Darüber hinaus besteht Papier aus nachwachsenden Rohstoffen und ist folglich sowohl in großen Mengen günstig verfügbar, als auch bioabbaubar und biokompatibel. Im Gegensatz hierzu ist Nitrocellulose aufgrund ihrer aufwändigen Herstellungsweise und einer Reihe hierfür benötigter Additive deutlich teurer. Zudem ist sie meist aufwändig zu entsorgen, da das brüchige Material durch Vliese oder Folien stabilisiert werden muss.^[6, 12-13]

Entscheidend in Bezug auf die Grenzen der kommerziellen Schnelltests ist allerdings vor allem die Tatsache, dass durch Mikrostrukturierung von Papier und "sekundäre Fluidtransportsteuerungstechniken" auch komplexere Analysen in μ PADs realisiert werden können. Forschung auf dem Gebiet der Detektionsmethoden bietet Potential für eine Erhöhung der Sensitivität und Quantifizierung der μ PAD-basierten Tests. In den folgenden drei Abschnitten 1.1–1.3 sollen diese zentralen Aspekte der μ PADs kurz vorgestellt werden.

1.1. Mikrostrukturierung von Papiersubstraten

Seit 2007 Martinez *et al.*^[15] das erste zweidimensionale, mikrofluidische und papierbasierte Analysesystem zur zeitgleichen Detektion von Glucose und Proteinen aus künstlichem Urin publizierten, stieg die Zahl der Veröffentlichungen auf dem Gebiet der " μ PADs" sprunghaft an.^[16] Zentral für Martinez' Entwicklung war die orts aufgelöste Implementierung hydrophober Barrieren in Papier zur gezielten Aufspaltung einer wasserbasierten Analyseflüssigkeit (z.B. künstlicher Urin) in gleichzeitig mehrere Detektionsorte. Seither widmen sich zahlreiche Arbeitsgruppen der Entwicklung verschiedenster Methoden zur Mikrostrukturierung von Papiersubstraten. Abhängig von der Methode können hydrophobe Barrieren durch physikalische Blockierung der Poren bzw. Modifikation der Faseroberfläche, wobei das hydrophobe Material nur physisorbiert ist, entstehen. Alternativ werden hydrophobe Barrieren durch die chemische Modifikation der Faseroberfläche, bei der die hydrophoben Materialien direkt mit der Cellulose reagieren und so kovalente Bindungen eingehen, aufgebaut.^[17] Einen guten Überblick über bekannte Strukturierungsmethoden bieten mittlerweile eine Vielzahl von Übersichtsartikeln.^[4, 6, 13, 16-18] Daher soll im Folgenden kein allumfassender Einblick in alle Techniken gegeben werden. Stattdessen soll ausschließlich auf Methoden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als interessant erschienen, genauer eingegangen werden. Dem interessierten Leser wird für einen strukturierten Überblick über alle Techniken besonders der Beitrag von Xia *et al.*^[11] aus 2016 empfohlen.

Mikrostrukturierung mittels Wachs- und AKD-Druck

Ein Übersichtsartikel von Yamanda *et al.*^[16] aus 2015 fokussiert vor allem digitale Drucktechniken als "ansprechende Lösung" zur Mikrostrukturierung aufgrund der Einfachheit, Reproduzierbarkeit, Kosteneffizienz und des Upscaling-Potentials der Methode. Bereits Li *et al.*^[17] bezeichneten Wachs- und AKD-Druck als die vielversprechendsten Strukturierungsmethoden aufgrund ihrer geringen Kosten, ihrer leichten und schnellen Durchführung sowie des Potentials zur Massenproduktion. Folglich soll das Potential dieser beiden Methoden diskutiert werden.

Die unter den physikalischen Strukturierungsmethoden vielversprechendste Methode ist der von Lu *et al.*^[19] (2009) und Carrilho *et al.*^[20] (2009) unabhängig voneinander beschriebene Wachsdruck (Abbildung 4). Ein kommerziell erhältlicher Wachsdrucker bringt flüssiges Wachs, das bei Kontakt mit der Papieroberfläche direkt wieder fest wird, in der gewünschten Struktur auf der Papieroberfläche auf. In einem zweiten Schritt wird das Wachs mit einer Heizquelle wie einem Ofen oder einer Heizplatte erhitzt/verflüssigt. So dringt es in das Substrat ein, wo es nach Erkalten wieder verfestigt und eine hydrophobe Barriere im hydrophilen Material bildet.^[16] Diese Methode ermöglicht eine schnelle und günstige Produktion einer großen Anzahl von " μ PADs", die besonders für infrastrukturell schwache Gebiete geeignet sind.^[6, 13, 17] Durch das Aufheizen des Wachses im zweiten Produktionsschritt dringt das Wachs nicht nur wie gewünscht horizontal sondern auch vertikal ins Fasernetzwerk ein, was zu einer reduzierten Auflösung der erzeugten Strukturierung führt.^[6, 17] Dies wurde allerdings von Carrilho *et al.*^[20] untersucht und konnte bereits beim Druck beachtet werden. Trotz der genannten Vorteile der Methode handelt es sich hierbei "nur" um eine physikalische Strukturierungsmethode. Das bedeutet, dass ausschließlich physikalische Wechselwirkungen zwischen Wachs und Cellulosefasern bestehen, die leicht durch mechanische, thermische oder chemische Beanspruchung des Systems gestört werden können. Auch könnten entsprechende Lösungsmittel die Wachsschicht vom Substratmaterial einfach herunter lösen.^[21]

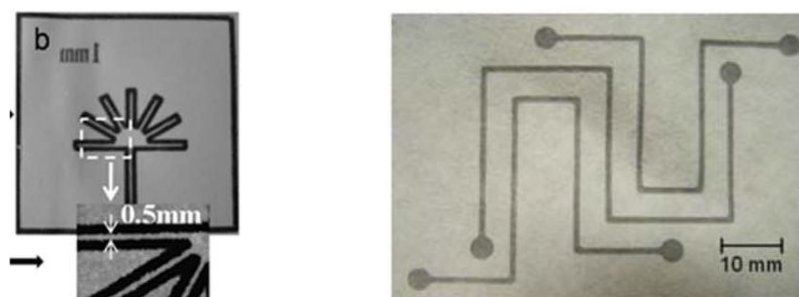


Abbildung 4: Links: Fotografie eines wachsgedruckten μ PADs.^[19] Rechts: Fotografie eines AKD-gedruckten μ PADs.^[22]

Hydrophobe Barrieren, die durch chemische Modifikation kovalent an die Cellulosefasern gebunden sind, erweisen sich stattdessen als deutlich stabiler in Bezug auf mechanische, thermische oder chemische Beanspruchung. Die in diesem Bereich vielversprechendste Methode ist die chemische Modifikation der Celluloseoberfläche mit Alkylketen-Dimeren (AKD). Wie von Li *et al.*^[22] publiziert, wird dabei im einfachsten Fall eine Mikrostruktur von einem Drucker mit einer AKD-Lösung als Tinte auf das gewünschte Substrat aufgebracht. Durch anschließendes Erhitzen reagieren die Lactongruppen der AKDs mit den Hydroxylgruppen der Cellulose in einer Veresterungsreaktion und binden so kovalent ans Papier. Zwar erweisen sich μ PADs mittels AKD-Strukturierung als deutlich stabiler als wachsgedruckte Strukturen, allerdings ist diese Methode ausschließlich zur hydrophoben Strukturierung von Cellulose geeignet. Andere Funktionalitäten können auf diese Weise nicht in μ PADs eingebracht werden.

Mikrostrukturierung mittels photoreaktiver Polymere

Aus diesem Grund geriet die von Böhm *et al.*^[21, 23] publizierte Variante der Photolithographie mittels reaktiver Polymere in den Fokus (Abbildung 5). Als Alleinstellungsmerkmal ermöglicht diese Methode die kovalente Bindung verschiedener Funktionalitäten an die Papieroberfläche. Nach Böhm *et al.*^[23] wird das Papiersubstrat zur Mikrostrukturierung in einer Lösung eines photoreaktiven Copolymers tauchbeschichtet, sodass nach Trocknung Polymer auf den Cellulosefasern physisorbiert ist ("film deposition"). Mittels UV-Bestrahlung durch eine Maske wird das photoreaktive Polymer als Netzwerk kovalent an die Cellulosefasern gebunden ("illumination"). Dies ist möglich, da das Polymer neben dem meist hydrophoben aber generell beliebigen Bulkmonomer in geringem Anteil mit einem benzophenonhaltigen Monomer copolymerisiert ist. Durch UV-Bestrahlung entsteht ein Benzophenon-Biradikal, das bevorzugt mit einer Alkylgruppe einer Cellulosefaser oder einer (der selben) Polymerkette reagiert.^[24] Die so in den belichteten Bereichen entstehenden Polymernetzwerke sind kovalent an die Celluloseoberfläche gebunden. Das in den unbelichteten Bereich ausschließlich physisorbierte Polymer kann durch Lösungsmittelextraktion vollständig entfernt werden, während das kovalent gebundene Polymernetzwerk davon unbeeinflusst bleibt ("extraction").

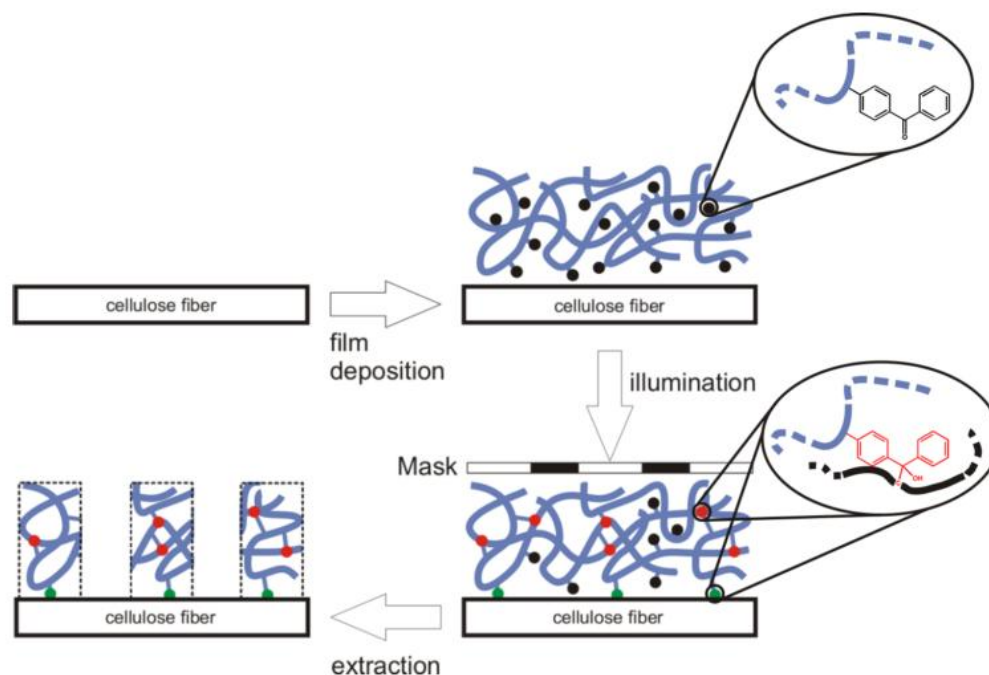


Abbildung 5: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Mikrostrukturierung eines Papiersubstrats mittels Photolithographie mit photoreaktiven Polymeren (blau). Benzophenonhaltige Monomereinheiten in unbestrahltem Zustand sind als schwarze Punkte dargestellt. Benzophenonhaltige Monomereinheiten, die kovalent an Cellulosefasern binden, sind als grüne Punkte dargestellt und benzophenonhaltige Monomereinheiten, die mit Alkylgruppen des Polymers reagieren, sind als rote Punkte dargestellt.^[23]

Wie beschrieben, beruht die kovalente Anbindung auf einem geringen Anteil (<2,5 mol-%) an benzophenonhaltigen Monomeren, wie 4-Methacryloyloxybenzophenon (MABP) im Copolymer. Die photoreaktive Gruppe Benzophenon kann mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von ca. 340 nm vom Singulett-Grundzustand S_0 in den Singulett-Zustände S_1 (n, π^* -Übergang) angeregt werden. In einen anschließenden "intersystem crossing"-Prozess können eine Vielzahl der angeregten Moleküle vom S_1 -Zustand über den Triplett-Zustand T_2 (π, π^*) in den Triplett-Zustand T_1 (n, π^*) übergehen.

Dieser Zustand weist einen biradikalen Charakter auf und ermöglicht so eine Reaktion mit in der Nähe befindlichen Molekülen. Diese kann in zwei Schritten erfolgen. Zunächst abstrahiert das Sauerstoffradikal eine Wasserstoffatom von einer benachbarten Alkylgruppe. Anschließend rekombiniert das so entstandene Alkyradikal mit dem Kohlenstoffradikal der Benzophenongruppe. Eine kovalente Bindung zwischen der benzophenonhaltigen Polymerkette und der Alkylgruppe einer Cellulosefaser oder einer anderen Polymerkette entsteht (Abbildung 6).

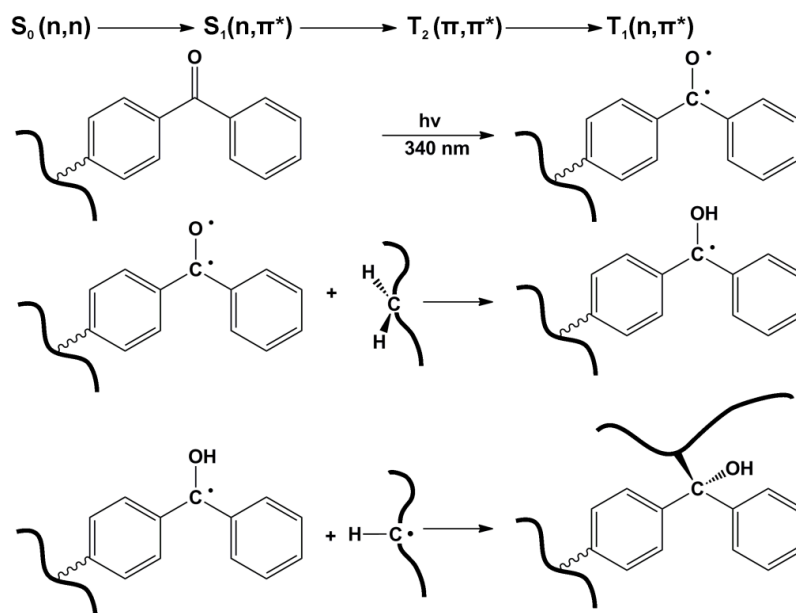


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Reaktion eines Benzophenon-Biradikals mit einer Alkylgruppe einer Cellulosefaser oder Polymerkette (nach Freidank^[25]).

Böhm *et al.* setzen die Technik der photolithographischen Mikrostrukturierung vielseitig ein. Durch Copolymere mit Polymethylmethacrylat^[21] oder Polystyrol^[23] als Bulkpolymere konnten Mikrostrukturen in Papiersubstrate eingebracht werden, die durch ihre hydrophoben Eigenschaften als Barrieren für wasserbasierte Flüssigkeiten dienen. So können sie die Fließrichtung von wasserbasierten Fluiden definieren. In auf diese Weise implementierten Kanalstrukturen untersuchten Böhm *et al.* den kapillarkraftgetriebenen Fluidtransport. Sie konnten einen linearen Zusammenhang zwischen der von der Fluidfront zurückgelegten Strecke und der Wurzel der vergangenen Zeit, wie durch die Lucas-Washburn-Gleichung (Abschnitt 3.1.4) beschrieben, feststellen. Darüber hinaus untersuchten sie mithilfe solcher Kanalstrukturen den Einfluss des Fasertyps und des Flächengewichtes des Papiersubstrats sowie der Breite des implementierten Kanals auf die Flussraten.^[26]

Der Einbau fluoreszierender Monomere in die Copolymere ermöglicht die Untersuchung der Verteilung solcher Copolymere im ebenfalls fluoreszenzmarkierten Cellulosefasernetzwerk eines Papiers mittels Konfokalmikroskopie. Darüber hinaus wurde der Transport FITC-markierter Dextranlösungen in beschriebenen Kanalstrukturen ebenfalls konfokalmikroskopisch untersucht.^[27] In seiner Dissertation zeigte Böhm das Anwendungspotential dieser Strukturierungsmethode.^[24] Dazu synthetisierte Böhm ein hydrophiles Copolymer auf Polydimethylacrylamid(PDMAA)-Basis, in das reaktive *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS) eingebaut wurden. Diese Gruppen reagieren in einer nukleophilen Substitutionsreaktion spezifisch mit primären Aminen. So konnte das Polymer genutzt werden, um verschiedene Moleküle mit primären Aminen über das kovalent gebundene Polymer mit NHS-Estern kovalent an die Paperoberfläche zu binden. Die auf diese Weise realisierte,

kovalente Anbindung eines *N*-heterocyclischen Carben-Goldkomplexes [Au(HNC)Cl] an ein Papiersubstrat zeigte in ersten Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse. Das modifizierte Papier kam als Katalysator einer Hydratisierungsreaktion von Phenylacetylen zu aromatischen Ketonen zum Einsatz. In einem zweiten Beispiel implementierte Böhm in eine Kanalstruktur ortsspezifisch einige Bereiche mit hydrophilem, reaktivem Copolymer. Diese Bereiche werden als "Patches" bezeichnet. Indem Böhm an zwei solcher Patches verschiedenen Enzyme ortsspezifisch bindet, ermöglicht er eine fluidtransportgesteuerte Kaskadenreaktion auf Papier (Abbildung 7).



Abbildung 7: Fotografie eines mikrostrukturierten Papiersubstrats zur Durchführung einer Kaskadenreaktion unter UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Eine β -D-Glucoselösung wird von links nach rechts durch den Y-förmigen mikrostrukturierten Kanal im Papiersubstrat geleitet. Am ersten Polymerpatch im Kanal ("GOx") ist Glucoseoxidase gebunden. Diese oxidiert Glucose zu D-Glucono- δ -lacton. Dabei entsteht auch Wasserstoffperoxid. Beides wird durch den Fluidstrom im Kanal weitertransportiert und gelangt zum zweiten Patch ("POx"), der das Enzym Peroxidase bindet. Hier reagiert das applizierte farblose Amplex Red mit dem Wasserstoffperoxid, katalysiert durch die Peroxidase, zu rot fluoreszierendem Resorufin. Dieses wird ebenfalls im Fluidstrom weiter transportiert.^[24]

Mikrostrukturierung für lösungsmittelbasierte Fluide

Die beschriebene Methode der photolithographischen Mikrostrukturierung mittels reaktiver Polymeren nach Böhm *et al.*^[21, 23] erweist sich wie beschrieben als sehr vielseitig und anwendbar für nahezu jede Strukturierungsaufgabe. Problematisch wird die Stabilität der Barrieren bei dieser und auch allen anderen bisher beschriebenen Methoden allerdings sobald außer wasserbasierten auch lösungsmittelbasierte Fluide eingesetzt werden sollen. Carrilho *et al.*^[20] stellten bereits fest, dass wachsgedruckte Barrieren zwar gegen wässrige Lösungen verschiedenster pH-Werte und Glycerin stabil sind, allerdings sind sie unbeständig gegen typische Lösungsmittel wie Aceton, Dichlormethan oder verschiedene Alkohole. Wang *et al.*^[28] untersuchten neben der Stabilität wachsgedruckter Barrieren auch die Stabilität von AKD-Barrieren und gedruckter Methylsilsesquioxan(MSQ)-Barrieren, eine erstmals hier publizierte Methode zur Mikrostrukturierung von Papiersubstraten. Die Stabilität bei Lösungsmitteln wie Glycerin und DMSO war für alle drei Methoden ausreichend. Toluolstabil sind ausschließlich die MSQ-Barrieren. Bei typischen Alkoholen wie Methanol und Isopropanol versagten allerdings alle drei Strukturierungsmethoden. Zur Lösungsmittelstabilität der nach Böhm *et al.* erzeugten Strukturen sind keine Untersuchungen publiziert, allerdings konnte in dieser Arbeit (Abschnitt 7.2.4) festgestellt werden, dass auch diese Strukturen instabil gegenüber bestimmten Lösungsmitteln sind.

Zwei interessante Lösungsansätze für dieses Problem sollen abschließend im Folgenden vorgestellt werden: Glavan *et al.*^[29] publizierten eine Methode zur Herstellung ominophober Papiere mit Fluoralkyltrichlorsilanen aufgebracht durch Dampfphasensilanisierung. Die so modifizierten Papiere sind wasserabweisend ebenso wie stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln mit einer Oberflächenspannung $\geq 27,4 \text{ mN m}^{-1}$ (Hexadekan). Anhand von Kontaktwinkelmessungen wurde Resistenz der Beschichtung gegen Hexadekan ($27,4 \text{ mN m}^{-1}$), DMF ($37,1 \text{ mN m}^{-1}$), verschiedene Glycerole und Wasser ($72,8 \text{ mN m}^{-1}$) gezeigt. Nicht stabil waren allerdings auch diese Strukturen aufgrund der geringen Oberflächenspannung der Lösungsmittel gegen Pentan ($15,1 \text{ mN m}^{-1}$) und Ethanol ($22,3 \text{ mN m}^{-1}$).^[29b]

Eine in Bezug auf das Fluid universelle und daher unbedingt zu erwähnende Methode ist die Strukturierung von Papierproben durch "Cutting".^[17] In diesem Fall dient schlichtweg Luft als stabile Barriere. Abhängig von der gewünschten Genauigkeit des Zuschnitts können Geräte von der Schere bis hin zu Präzisionsinstrumenten wie computergesteuerte X-Y-Messerschneider^[30] oder einen CO₂-Laserschneider^[31] verwendet werden (Abbildung 8). Die sehr günstige und schnelle Produktion, die Möglichkeit der Umsetzung in der Massenproduktion sowie die Auflösungsgenauigkeit sprechen für diese Methode. Nachteilig zu erwähnen ist, dass sich das Papier gerade durch das Schneiden mit einem Laser stark an den Kanten erwärmt.^[31] Auch das Ausfransen an den Schneidekanten bei anderen Methoden wie dem Messerschneider muss kritisch beachtet werden.^[30] Darüber hinaus ist ein Trägermaterial für die Anwendung und Stabilität der μ PADs zwingend erforderlich. Dennoch ist diese Technik zur Zeit die einzige Literatur bekannte, auch für Fluide geringer Oberflächenspannung wie Alkohole geeignete Strukturierungsmethode.

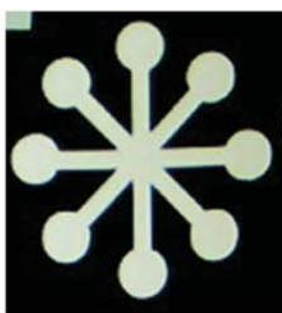


Abbildung 8: Fotografie eines mittels computergesteuertem X-Y-Messerschneiders hergestellten Zuschnitts.^[19]

1.2. Sekundäre Fluidtransportsteuerungstechniken

Bekannte bioanalytische Tests stellen oft eine Reihe von Anforderungen an den Nutzer. Selbst bei benutzerfreundlichen *Lateral Flow* Tests muss häufig nach dem Einsatz einer definierten Probenmenge eine exakt festgelegte Zeit abgewartet werden, bis ein Ergebnis ermittelt werden kann. In Labortests werden darüber hinaus meist noch zusätzlich qualitativ hochwertige Reagenzien oder besondere Auslesegeräte benötigt. Die Anwendung von μ PADs dagegen verspricht die Möglichkeit all diese Voraussetzungen im Testsystems zu integrieren, sodass der Benutzer lediglich eine ungefähre Probenmenge auftragen muss, um das finale Testergebnis zu ermitteln.^[4] Um die Benutzerfreundlichkeit dieser Methode gewährleisten zu können, wurden und werden so genannte "sekundäre Fluidtransportsteuerungstechniken" (SFT) für μ PADs entwickelt.

SFT dienen der gezielten Steuerung von Flüssigkeitsströmen in μ PADs. In Kombination mit Mikrostrukturierungsmethoden (Abschnitt 1.1) bieten sie beispielsweise die Möglichkeit Fluide gezielt aufzuspalten, zu verteilen, zu mischen, zu filtrieren oder ihren Transport zu verlangsamen.^[32] SFTs sollen die Möglichkeit schaffen μ PADs als autonome Analytik auch für komplexe Analyseverfahren als Alternative zu herkömmlichen Laboranalysen oder nitrocellulosebasierten *Lateral Flow* Tests zugänglich zu machen.^[18b] Im Folgenden werden einige ausgewählte Techniken vorgestellt. Darüber hinaus werden dem interessierten Leser ergänzend die Reviews von Yetisen *et al.*^[4], Cate *et al.*^[18b] und Böhm *et al.*^[33] nahegelegt.

Fluidaufspaltung (2D und 3D)

Die gezielte Aufspaltung eines Fluidstroms ermöglicht es eine Probe gleichzeitig auf mehrere Analyten zu untersuchen.^[32] Eine gezielte Mikrostrukturierung dirigiert ein sich kapillarkraftgetrieben zweidimensional ausbreitendes Probenfluid gleichzeitig an mehrere Detektionsorte. So kann beispielsweise nach Hossain *et al.*^[34] parallel die Anwesenheit verschiedener Schwermetallionen in Wasser kolorimetrisch angezeigt werden. Folglich liegt ein Ergebnis schneller und unter Anwendung eines deutlich geringeren Probenvolumens vor, als wenn jedes Ion einzeln getestet werden müsste.

Eine dreidimensionale Aufspaltung ist zwar komplexer, reduziert das benötigte Probenvolumen für eine höhere Anzahl von Detektionsorten allerdings noch weiter.^[4] Generell sind zwei verschiedene Techniken zur Herstellung solcher dreidimensionaler Tests publiziert.^[4, 18b] Nach Liu *et al.*^[35] wird ein mikrostrukturiertes Papier so gefaltet, dass alle Schichten passend aufeinanderliegen, bevor das System in dieser Position durch eine Art Halter fixiert wird. Martinez *et al.*^[36] beschreiben eine Herangehensweise, bei der einzelne Papierschichten strukturiert, zurechtgeschnitten und durch Klebeschichten verbunden werden. Ein Vorteil dieser Technik ist, dass in den verschiedenen Schichten weitere Funktionalitäten eingebracht werden können.^[18b]

Programmieren und Timen

Um komplexe biochemischen Analysen realisieren zu können, ist die Koordination und das Timing des Zusammentreffens von Probe und Reagenzien oft kritisch.^[37] Daher haben sich eine Vielzahl von Arbeitsgruppen in den letzten Jahren mit der Entwicklung von SFTs beschäftigt, welche einen zeitgesteuerten Fluidstrom ermöglichen. Jahanshahi-Anbuhi *et al.*^[38] beschreiben beispielsweise die bis zu zehnfache Beschleunigung der Flussrate eines kapillarkraftgetriebenen Fluids in Papier zwischen zwei Polyesterfolien im Vergleich zu nicht eingeschlossenem Papier. Dies nutzen sie, um die Detektionszone eines Tests mit Enzymen zu präkonditionieren. Die ortsspezifische kontrollierte Verlangsamung eines Fluidstroms kann besonders für Enzymreaktionen und Immuntests relevant sein.^[32] Die Arbeitsgruppe um Paul Yager beschrieb bereits 2010 den Einfluss der Breite und Länge eines nitrocellulosebasierten mikrofluidischen Systems auf dessen Fluidtransportgeschwindigkeit.^[39] Auch zeigten sie, dass durch Einbringen von Saccharose in einem definierten Bereich eines Testsystems der Fluidfluss in diesem Bereich gezielt verlangsamt werden kann.^[40] Gezieltes Mischen und Verdünnen von Flüssigkeitsströmen stand ebenfalls bereits im Fokus der Forschungsgruppe um Yager. Osborn *et al.*^[3] publizierten einen so genannten "Y-Mixer", der kapillarkraftgetriebene Fluidströme aus zwei verschiedenen Reservoirs gleichmäßig mischt. Ferner wurde ein System zur inhärenten Verdünnung einer Probe durch nachträgliches Zuleiten von reinem Lösungsmittel vorgestellt.

Der sequentielle Transport von ortsspezifisch lokalisierten Reagenzien zu einem gemeinsamen, definierten Ort innerhalb eines Testsystems ist besonders interessant für Nachweise, die nacheinander mehrerer Reagenzien bedürfen. Li *et al.*^[41] publizierten bereits 2008 einen "papierbasierten, mikrofluidischen Reaktor". Zwei unabhängige Reservoirs sind dabei durch eine Mikrostruktur mit einem gemeinsamen "Reaktionsbereich" verbunden. Integrierte "Schalter" ermöglichen eine manuelle Steuerung über den zugeführten Fluidstrom. Diese Schalter bestehen aus Strukturbereichen, die an drei Stellen eingeschnitten sind, sodass sie umgeklappt werden können (Abbildung 9). Auch die Gruppe um Paul Yager betrieb auf diesem Gebiet intensive Forschung und entwickelte gleich mehrere Techniken, um Reagenzien aus verschiedenen Reservoirs planbar nacheinander und ohne weiteres Eingreifen des Benutzers in eine gemeinsame Reaktionszone transportieren.^[39-40, 42]

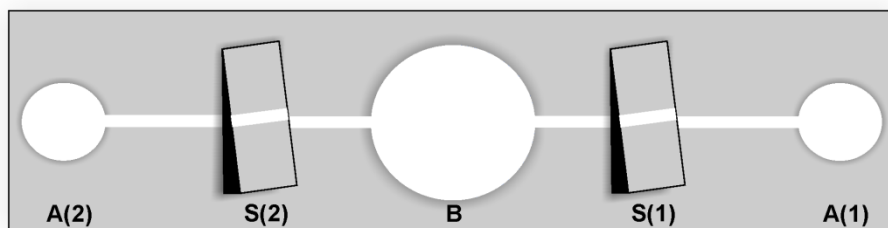


Abbildung 9: Schematisch Darstellung eines "papierbasierten, mikrofluidischen Reaktors". Der kapillarkraftgetriebene Transport zum Reaktionsbereich (B) der in Reservoir A(1) oder A(2) aufgetragenen Reagenzien kann durch die beiden Schalter S(1) und S(2) manuell durch den Benutzer gesteuert werden (nach Li *et al.*^[41]).

Schließlich kann auch das gezielte Abbrechen eines Flüssigkeitsstroms, beispielsweise zur Einstellung einer definierten Flüssigkeitsmenge, für biochemische Analysen relevant sein. Houghtaling *et al.*^[43] beschrieben eine Methode, die den Fluidtransport automatisch nach einer definierten Menge Fluid abbricht. Dazu verbinden sie das Fluidreservoir mit dem Detektionsbereich eines möglichen Tests über eine "Brücke" aus wasserlöslichen Zuckern (Mannose, Trehalose). Durch den Fluidtransport über diese Brücke lösen sich die Zucker nach und nach auf, sodass nach einer durch die Ausmaße der Brücke definierten Menge transportierter Flüssigkeit die Brücke "bricht" (sich in einem bestimmten Bereich vollständig aufgelöst) und so den Fluidtransport in diesem Fall irreversibel beendet.

Filtration und Konzentration

Sollen μ PADs in der klinischen Diagnostik angewendet werden, kommt auch der systeminhärenten Filtration eine große Bedeutung zu. Die meisten biologischen Proben bedürfen einer Vorbehandlung durch eine Separationsmethode wie Zentrifugation oder Sedimentation, um Zellen, die in Analysen oft störend wirken, abzutrennen.^[44] Dabei ist die Filtration von Blutzellen aus Vollblut zur Gewinnung von Blutplasma zwecks Analyse ein wichtiges Thema. Yang *et al.*^[45] entwickelten einen μ PAD in dem Vollblut auf einen Separationsbereich aufgebracht wird in dem Antikörper zu einer Koagulation der roten Blutkörperchen führen. Folglich können diese im Gegensatz zu Blutplasma nicht mehr durch das Papiernetzwerk transportiert werden und erreichen die benachbarten Detektionsorte nicht. So kann die Farbe der roten Blutkörperchen nicht mit einer kolorimetrischen Detektion von Glucose interferieren. Songjaroen *et al.*^[44] wählten eine andere Herangehensweise zur Blutseparation. Sie schalten einem mikrostrukturierten Papier eine kommerziell erhältliche Blutseparationsmembran vor. Diese fängt Blutzellen ab, sodass ausschließlich reines Plasma kapillarkraftgetrieben durch das Papier zu den Detektionsorten transportiert wird. Weitere Publikationen zur Blutseparation in μ PADs sind bekannt, sollen aber nicht weiter diskutiert werden.^[46]

Li *et al.*^[41] publizierten neben dem bereits beschriebenen "papierbasierten, mikrofluidischen Reaktor" auch einen "papierbasierten, mikrofluidischen Separator". Das zentrale Element dieser SFTs ist ein mikrostrukturierter, silicabeschichteter Papierstreifen. Wird dieser Separator durch Verschieben (Abbildung 10) mit dem mikrostrukturierten Kanal verbunden, filtert er pinkfarbene Ink-jet Tinte aus einer kapillarkraftgetriebenen transportierten Lösung, sodass hinter dem Separator ausschließlich reines Fluid weiter transportiert wird.

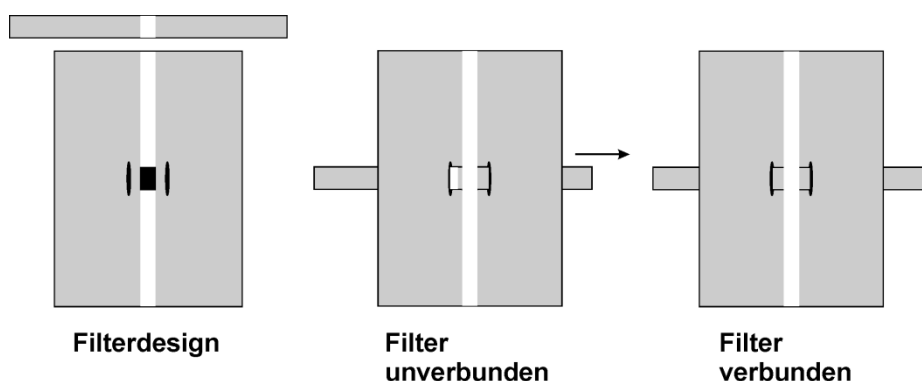


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines "papierbasierten, mikrofluidischen Separators". Durch Verschieben des Papierstreifens, wird Fluid kapillarkraftgetrieben weiter transportiert und dabei filtriert (nach Li *et al.*^[41]).

Gong *et al.*^[37] beschrieben eine instrumentell gestützte Methode zur Konzentration geladen Farbstoffmoleküle. Eine vollständig mit Pufferlösung gefüllte nanoporöse Membran (Nafion 117) auf Basis von Filterpapier wird mit einem Ionenkonzentrationspolarisator (ICP) gekoppelt. Durch Anlegen einer Spannung werden negativ geladene Farbstoffmoleküle im Bereich der positiv geladenen Anode konzentriert. Anwendungsorientiert konnte so die Detektionsgrenze von fluoreszenzmarkiertem BSA fünffach auf 2 pmol mL^{-1} gesenkt werden.

1.3. Detektieren und Auslesen

Üblicherweise erfolgt eine Verstärkung des Signals eines Tests und damit eine Erhöhung dessen Sensitivität durch die Verstärkung des Signals eines Analytmoleküls. Klassisch hierfür sind in der Biochemie antikörperbasierte Nachweisverfahren wie *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA). Cheng *et al.*^[47] übertrugen das allgemein bekannte Prinzip auf Papiersubstrate (Entwicklung des P-ELISAs). Mittels Photolithographie wird eine "96-Kavitäten-Platte" auf Papier hergestellt.^[15] Die Detektion eines Antigens (Analyt) erfolgt anschließend wie im herkömmlichen indirekten ELISA in fünf Stufen. Jeder Kavität der Platte wird zunächst die zu untersuchende Probe zugesetzt und so das Antigen/der Analyt immobilisiert. Unbelegte Adsorptionsplätze werden anschließend blockiert, um unspezifische Wechselwirkungen des anschließend aufgetragenen konjugierten Antikörpers zu verhindern. Er bindet spezifisch an das Antigen. Nachdem ungebundene Antikörper durch einen Waschschrift entfernt wurden, wird die passende Substratlösung des antikörperkonjugierten Enzyms (Alkalischer Phosphatase (ALP)) zugegeben. Das an den Antikörper konjugierte ALP setzt die gelbe 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) / Nitroblautetrazolium (NBT)-Lösung um, sodass bei Anwesenheit des Antigens ein violetter Niederschlag ausfällt (Abbildung 11). Da ein konjugierter Antikörper mehrere Substratmoleküle umsetzen kann, wird das Signal eines Antigens vermehrt und so die Sensitivität des Tests erhöht. P-ELISAs weisen gegenüber konventioneller ELISAs eine kürzere Inkubationszeit, einen geringeren Reagenzienverbrauch sowie günstigeres Equipment bei einer leicht verringerten Sensitivität auf.

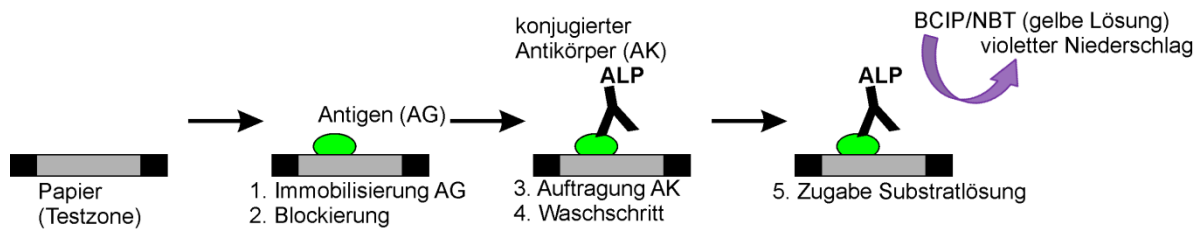


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines papierbasierten *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (P-ELISA). Nach Immobilisierung des Antigens (grün) in einer Kavität der papierbasierten, mikrostrukturierten "96-Kavitäten-Platte" mit anschließender Blockierung freier Adsorptionsplätze, bindet der mit alkalischer Phosphatase (APL) konjugierte Antikörper an das Antigen. Nachdem ungebundene Antikörper herunter gewaschen wurden, wird gelbe BCIP/NBT-Lösung aufgetragen. Diese wird von ALP zu einem violetten Niederschlag umgesetzt und so die Anwesenheit des Antigens nachgewiesen (nach Cheng *et al.*^[47]).

Der P-ELISA ist ein Beispiel für einen kolorimetrischen Nachweis. Bei dieser einfachsten und daher meist genutzten Detektionsmethode eines μ PADs wird eine Farbänderung in Gegenwart des Analyten für dessen Nachweis genutzt.^[6] Üblicherweise wird Papier so mikrostrukturiert, dass mehrere Detektionszonen entstehen, die vom Probenfluid durch kapillarkraftgetriebenen Transport erreicht werden können. Abhängig vom zu detektierenden Analyt werden in die einzelnen Detektionszonen Reagenzien eingebracht. Diese reagieren meist enzymatischen oder chemischen mit den Analyten und führen so zu einer Farbänderung, die die Anwesenheit des Analyten nachweist.^[4] Für qualitative Ja/Nein-Antworten sind kolorimetrische Nachweise folglich bestens geeignet. Der weiße Papierhintergrund ist aufgrund seines guten Kontrasts ein optimales Substrat, sodass eine qualitative Testinterpretation ohne Hilfsmittel möglich ist.^[6]

Ansätze zur Quantifizierung der Ergebnisse kolorimetrischer Tests

Auch eine quantitative Auswertung kolorimetrischer Tests ist generell möglich, da die Farbintensität meist proportional zur detektierten Analytmenge ist. Allerdings sind bei quantitativen Auswertungen einige Aspekte zu beachten.^[18b] Zunächst benötigen diese Test üblicherweise ein exakt definiertes Probenvolumen, was zur Folge hat, dass Hilfsmittel wie Pipetten zur Probenauftragung benötigt werden. Klassische μ PADs umgehen diese Forderung häufig durch ihren Aufbau. Durch den kapillarkraftgetriebenen Fluidtransport werden bereits intrinsisch relativ konstante Fluidvolumina in die Detektionszonen transportiert. Des Weiteren müssen quantitative Tests häufig nach definierten Zeiten ausgewertet werden.^[48] Dieser Anforderung kann auch in infrastrukturell schwachen Gebieten meist genügt werden, da ausschließlich eine Uhr benötigt wird. Selbst wenn diese nicht vorhanden ist, publizierten beispielsweise Noh *et al.*^[49] bereits einen Lösungsansatz für dieses Problem: eine testinhärenten Timer. Durch Auftragen von Paraffinwachs auf Papier, wird der Kontaktwinkel im modifizierten Bereich erhöht und folglich die Penetrationsgeschwindigkeit eines wasserbasierten Fluids verringert. Diese Technik wird dazu genutzt einen Fluidstrom so zu verlangsamen, dass er das Ende eines vertikalen Kanals nach einer definierten Zeit erreicht und dort durch das Erscheinen eines Farbspots anzeigt, dass die vordefinierte Zeit abgelaufen ist (Abbildung 12).

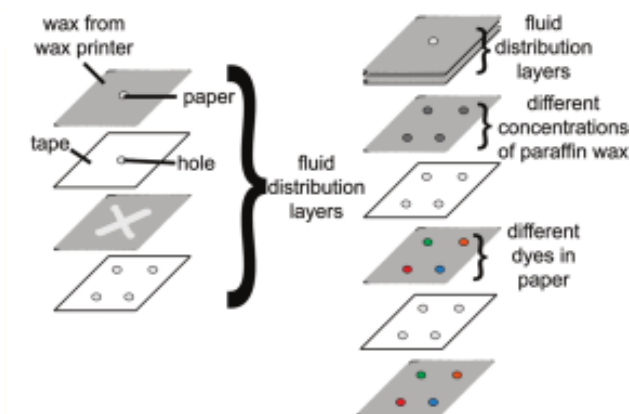


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines mikrofluidischen Timers. Verschiedene Konzentrationen an Paraffinwachs in der fünften Schicht des 3D μ PADs sorgen für unterschiedliche Verlangsamung des Fluidstroms. Folglich erscheinen auf der Unterseite des Test unterschiedlich farbige Spots nach 1, 1,5, 2 und 3 min.^[49]

Eine quantitative Auswertung von μ PADs mit bloßem Auge durch ungeschultes Personal kann allerdings dennoch problematisch sein, da eine solche Beurteilung immer subjektiv erfolgt.^[6] Da die Nachfrage nach sensitiven und quantitativen Analysemethoden vor allen in Entwicklungsländern immer größer wird, wurde auch im Bereich der μ PADs verstärkt nach Möglichkeiten für eine vertrauenswürdige, quantitative Auswertung der Tests gesucht. Dabei rückten zunächst tragbare Auslesegeräte in den Fokus der Forschung. Die heute auch kommerziell erhältlichen Geräte verfügen über Möglichkeiten des Anschlusses an andere elektronische Geräte sowie drahtlose Datenübertragung.^[4] Allerdings können in ressourcenlimitierten Gebieten solche Geräte häufig nicht in adäquater Zahl zur Verfügung gestellt werden. Die zunehmende Verbreitung von Mobiltelefonen auch in ärmlichen Gegenden der Welt schaffte eine Alternative.^[50] Zwei verschiedene Ansätze werden verfolgt. Der erste Ansatz nutzt Mobiltelefone direkt als Analysegeräte vor Ort. Vorinstallierte Apps werten Aufnahmen der μ PADs direkt quantitativ aus. Der Ansatz der "Telemedizin" verfolgt die Idee das Handy lediglich als Aufnahmegerät zu nutzen. Das entstandene Bild wird an einen Server gesendet, ausgewertet und das Ergebnis zurück an das Handy versandt. Auch wenn diese Methoden die Möglichkeit der quantitativen Auswertung ohne spezielle Geräte bieten, so sind sie doch begrenzt in ihrer Anwendung. Mobiltelefone sind nicht optimal ausgelegt für diese Anwendungen. Sie sind verhältnismäßig teuer und sind den teilweise extremen Wetterbedingungen in einigen Gegenden nicht gewachsen. Des Weiteren sind die integrierten Kameras nicht auf die Aufnahme solcher Tests spezialisiert. Probleme mit standardisierter Bildabschattung, Belichtungsbedingungen, Sensitivität, Auflösung, Fokus und Hintergrundrauschen des Papiers verringern die Verwertbarkeit der Ergebnisse. Darüber hinaus entspricht der Ansatz Mobilfunkgeräte als Auslesegeräte für μ PADs zu verwenden nicht den Forderungen der WHO nach einer Anwendbarkeit solcher Tests ohne zusätzliche Geräte (vgl. Abschnitt 1.4).^[4]

Zuk *et al.*^[51] publizierten bereits 1985 eine Methode, in der sie den kapillarkraftgetriebene Transport eines Analyts in einem Papierstreifen nutzen, um anhand dessen Steighöhe, die in den Proben enthaltene Konzentration des Analyten zu quantifizieren. Cate *et al.*^[52] griffen kürzlich diese Technik auf, um sie weiterzuentwickeln und quantitative Nachweise für Schwermetallionen (Nickel), kleine biologische Moleküle (Glucose) und reaktive Sauerstoffspezies (Glutathion) zu designen. Dabei wird ein mikrostrukturiertes Papier mit Reagenzien abhängig von der Art des Analyts versehen, die unter Verbrauch des Analyts in dessen Anwesenheit eine Farbreaktion eingehen. Sobald das so präparierte Substrat getrocknet ist, wird eine definierte Menge zu untersuchende Lösung an einem Ende des Teststreifens aufgegeben. Kapillarkraftgetrieben wandert

die Fluidfront bis zum Ende der Mikrostruktur. Währenddessen reagiert der Analyt mit den Reagenzien, sodass diese unter Verbrauch des Analyts farbig werden. Überschüssiger Analyt wird solange weiter transportiert, bis er vollständig verbraucht ist. Folglich kann anhand der Länge des farbigen Streifens auf dessen Konzentration in der Lösung geschlossen werden (Abbildung 13).



Abbildung 13: Schematische Darstellung der Herstellung und Verwendung eines Teststreifens zur quantitativen Analyse. Ein mittels Wachsdruck mikrostrukturiertes Papiersubstrat wird lokal mit Reagenzien zur Farbreaktion mit dem zu detektierenden Analyten versehen. Nach Auftrag der Probe wandert die Fluidfront entlang der durch die Mikrostruktur vorgegebenen Richtung. Dabei verfärbt sich solange Reagenz bis der Analyt vollständig verbraucht ist und zeigt so mit Hilfe der angezeichneten Skala an, wie viel Analyt enthalten ist.^[52]

Lösungsansätze für gerätefreie, quantitative Auswertungen sind rar. Der einfachste Ansatz dafür ist wohl die Verwendung von Kalibrationsstandards, die der Benutzer direkt mit dem durchgeführten Test vergleichen kann. Kritisch ist dabei, dass eine solche Interpretation immer subjektiv ist. Uneinheitliche Farbverteilung, Hintergrundeinflüsse wie farbige Probenlösungen und variierende Test- und Lichtbedingungen erschweren eine exakte Beurteilung weiter.^[4]

Lewis *et al.*^[53] entwickelten einen Test zur semi-quantitativen Detektion von Wasserstoffperoxid mit einer Stoppuhr als einzigem Hilfsmittel. Dieses mikrofluidisch, achtlagige und dreidimensionale Testsystem besteht aus 16 Kavitäten, die mit dem zentralen Auftragungsbereich verbunden sind. In der siebten Schicht wird das aufgetragene Fluid zunächst in alle Kavitäten verteilt, sodass es anschließend separat durch die einzelnen Schichten in der Kavität transportiert werden kann. Die für die Funktion des Testsystems entscheidende Schicht (Abbildung 14, gelb) enthält als Detektionsreagenz hydrophobe Moleküle, die die Fluidpenetration in höher liegende Schichten unterbinden. Durch Reaktion dieser Moleküle mit dem Analyten werden sie allerdings hydrophil, woraufhin eine Probenpenetration nicht mehr behindert wird. Die verschiedenen Kavitäten enthalten eine unterschiedliche Menge an Reagenz, sodass abhängig von der Konzentration an Wasserstoffperoxid nur die Schichten in den Kavitäten wasserdurchlässig werden für die die Menge an enthaltenem Wasserstoffperoxid für eine Umsetzung des Detektionsreagenzes ausreicht. In diesen Kavitäten wird das Fluid in höher liegende Schichten weiter transportiert. Hier erreicht es eine Schicht mit wasserlöslichem Farbstoff, der die Kavitäten der obersten Schicht grün färbt. Da die Kavitäten mit einer konstant aufsteigenden Menge an Reagenz bestückt sind, ist die Zahl der gefärbten Kavitäten proportional zur Menge an enthaltenem Analyt in der Probe.

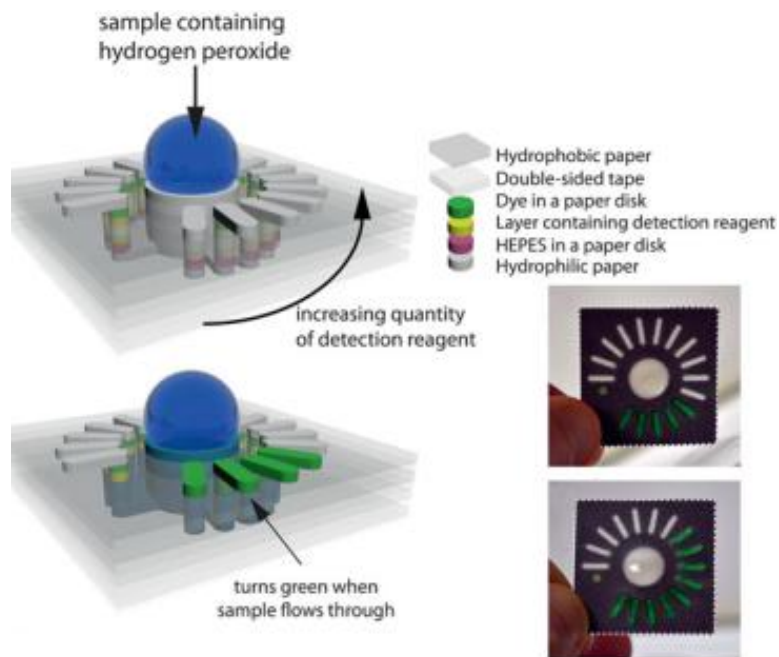


Abbildung 14: Schematische Darstellung des semi-quantitativen Wasserstoffperoxid-Nachweises, im Moment der Probenauftragung (oben) und 10 min nach Probenauftrag (unten). Rechts: Fotografien des Testsystems 10 min nach Applikation einer 1 mM bzw. 75 mM Wasserstoffperoxidlösung.^[53]

Alternativen zur kolorimetrischen Detektion

Anderen visuellen Nachweismethoden wie Fluoreszenz oder (Elektro-)Chemilumineszenz kommt aktuell eine deutlich geringere Bedeutung zu als dem kolorimetrischen Nachweis. Zwar wurden basierend auf diesen Techniken bereits einige Tests entwickelt (verschiedene Reviews ^[4, 6, 11, 13, 17]), dennoch ist ein entscheidender Nachteil, dass zur Detektion ein Lesegeräte benötigt wird. Auch können Ligninreste oder Aufheller im Papier gerade bei Fluoreszenzmessungen stören. Die weitere Entwicklung dieser Methoden wird folglich voraussichtlich von den Fortschritten in Bezug auf Kostenreduktion und Miniaturisierung der Lesegeräte abhängen.^[4, 6]

Neben visueller Detektion ist die elektrochemische Detektion die zweite viel erforschte Nachweismethode in μ PADs (verschiedene Reviews ^[11, 13, 17, 18b]). Üblicherweise wird dafür ein Drei-Elektroden-System aus Gegenelektrode, Referenzelektrode und Arbeitselektrode benötigt, das meist mit Hilfe von leitfähigen Tinten, wie Kohlenstoff- oder Silber/Silberchlorid-Tinte, aufgebracht wird. Eine schnellere Detektion höherer Sensitivität als bei kolorimetrischen Tests ist möglich. Allerdings wird dafür als zusätzliches Gerät ein Potentiostat benötigt.^[4, 13] Folglich liefert die elektrochemische Detektion zwar genauere Ergebnisse, allerdings unter erhöhter Komplexität und Kosten jedes Tests. Yetisen *et al.*^[4] stellen daher sogar die grundlegende Sinnhaftigkeit dieser Detektionsmethode in Frage, weshalb an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen werden soll.

1.4. Aktuelle Anwendung und derzeitige Grenzen für μ PADs

Die Möglichkeit durch sekundäre Fluidtransportsteuerungstechniken und neuste Detektions- und Auslesetechniken mehrere Analyseschritte in einen Test zu vereinen ("*fully intergated analytical devices*"), bietet großes Potential für μ PADs als Konkurrenz zu traditionellen Methoden besonders in ressourcenlimitierten Regionen.^[4] Das Gebiet wird aktuell intensiv beforscht. μ PADs zur Anwendung in der medizinischen Diagnostik (z.B. für Proteine^[15, 19, 36, 54]), der biochemischen Analytik (z.B. für Harnsäure^[55]), der Umweltanalytik (z.B. für Schwermetalle^[34, 56]) und der

Lebensmittelqualitätskontrolle (z.B. für Pestizide^[38, 57]) wurden in Laboren bereits entwickelt und erprobt.^[17] Erste Erfolge für μ PADs auch außerhalb des Labors sind bereits zu verzeichnen. Als Beispiel sei hier der Leberfunktionstest der US-amerikanischen Firma "Diagnostics for all" genannt. Mit Hilfe eines Tropfen Bluts kann dieser Test innerhalb von 15 Minuten die Lebergesundheit eines Patienten überprüfen. Dieser Test wurde bereits erfolgreich in Feldstudien verwendet und befindet sich im Zulassungsverfahren der FDA.^[58]

Um dauerhaft marktfähig und für die konkrete Anwendung interessant zu werden, müssen sich μ PADs jedoch einigen Herausforderungen stellen. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die Tatsache dar, dass es sich bei dem Substrat Papier um ein Naturprodukt handelt. Bereits unterschiedliche Faserchargen, aber auch unterschiedliche chemische und mechanische Vorbehandlung führen zu unterschiedlichen Fasereigenschaften.^[33] Dies erschwert die Verdrängung der künstlich erzeugten und daher sehr definierten Nitrocellulose vom Markt deutlich. Weitere entscheidende Anforderungen an μ PADs, besonders auch für die Anwendung in infrastrukturell schwachen Gebieten, sind klar zu definieren: kleine Probenvolumina, kurze Testdauer sowie vergleichbare oder sogar besserer Sensitivität und Spezifität in Bezug auf bekannte nitrocellulosebasierte Tests. Auch sollten zu analysierende Proben einer möglichst geringen Aufbereitung bedürfen und im Optimalfall ohne scharfe Gegenstände wie Nadeln zu gewinnen sein. Nur so könnten μ PADs auch durch minimal geschultes Personal angewendet werden.^[4] Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) fasst diese Anforderungen kurz unter dem Akronym "**ASSURED**" zusammen. Sie stellt fest: μ PADs müssen *Affordable* (bezahlbar), *Sensitive* (sensitiv), *Specific* (spezifisch), *User-friendly* (anwenderfreundlich), *Rapid and robust* (schnell und robust), *Equipment-free* (anwendbar ohne zusätzliche Ausrüstung) und *Delivered* (vorhanden) sein.^[59]

Yetisen *et al.*^[4] fordern vor allem eine Reduktion der Herstellungskosten der μ PADs um sie kommerziell konkurrenzfähig zu machen. Li *et al.*^[17] halten ein besseres Verständnis des kapillarkraftgetriebenen Fluidtransports für relevant, um diesen besser steuern zu können. Denn wie Mansfield *et al.*^[5] anhand von Nitrocellulosesubstraten feststellten, ist die Sensitivität eines Tests deutlich von dessen Flussrate abhängig. Garnier *et al.*^[6] verlangen nach einer besseren Leistung der μ PADs. Konkret fordern sie geringere Detektionsgrenzen (nano- oder pikomolarer Bereich) und Verbesserungen bei der Analyse komplexer Proben durch in die μ PADs integrierte Auftrennmechanismen (Erhöhung der Spezifität der Tests). Auf einige dieser Forderungen soll im Rahmen dieser Arbeit genauer eingegangen werden.

2. Motivation, Zielsetzung und Strategien der Dissertation

2.1. Motivation

Papier als alternatives Substratmaterial in *Lateral Flow Assays* gewinnt zunehmend an Bedeutung, denn es bietet viele Vorteile gegenüber dem heutzutage üblichen Substratmaterial Nitrocellulose. Beispielsweise ist es inhärent hydrophil, flexibel, wenig entzündlich sowie temperaturstabiler und günstiger als Nitrocellulose (Kapitel 1). Allerdings weist Papier als Substratmaterial aktuell noch eine Vielzahl an Limitierungen auf, die dazu führen, dass es auf dem Markt nicht ausreichend konkurrenzfähig gegenüber Nitrocellulose ist (Abschnitt 1.4). Beispielsweise ist der Fluid- und Analyttransport in mikrostrukturierten Papiersubstraten aktuell deutlich weniger erforscht und daher weniger definiert. Zentral für *Lateral Flow Assays* ist die direkte Anwendbarkeit der Testsysteme auf Proben komplexer Fluide wie Blut, Urin, Lebensmittel- oder Umweltproben, besonders für deren Verwendung in ressourcenlimitierten Gebieten. Da eine vorherige Aufreinigung oder Signalverstärkung der Proben zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität Zeit und Ressourcen kostet, sollte dies möglichst vermieden werden oder wenigstens assayinhärent erfolgen (Abschnitt 1.4).^[60] Die Überzeugung viele der aktuellen Limitierungen und Grenzen der *Lateral Flow Assays* durch vertiefende Forschung im Bereich der Mikrofluidik in papierbasierten mikrostrukturierten Papieren überwinden zu können, motiviert die vorliegende Arbeit.^[4, 8-9]

2.2. Zielsetzung

Das Kernziel der Arbeit ist folglich ein besseres Verständnis der Retention von Analyten im Substratmaterial Papier zu schaffen, um dieses Wissen anschließend gezielt für eine Steuerung der Retention der Analyten einsetzen zu können. Dieses Ziel ist, wie beschrieben, motiviert durch die Absicht μ PADs, z.B. durch eine Steigerung der Sensitivität und Spezifität, zu optimieren.

Dafür sollen folgende Leitfragen adressiert werden:

- Welche Papiersorten kommen als Substratmaterial in Frage? Welche Papiereigenschaften könnten besonders relevant für eine Retention von Analyten im Papier sein? Mit welchen Methoden können diese Eigenschaften charakterisiert werden?
- Welche Analyte sind als Modellmoleküle für erste Untersuchungen zur Retention in Papier geeignet? Welche Analyteigenschaften sind besonderes relevant für eine Wechselwirkung mit Papier und wie können diese charakterisiert werden?
- Wie kann die Retention der Modellanalyte in Papier untersucht werden?
- Welche Parameter der soliden und fluiden Phase könnten einen Einfluss auf die Wechselwirkung von Analyt und Papier nehmen? Wie wirken sich diese Parameter auf die Wechselwirkung aus? Was kann aus diesen Beobachtungen für die zentralen Einflüsse und Mechanismen der Wechselwirkung der Analyte mit dem Substratmaterial geschlossen werden?
- Welche Erkenntnisse aus der Untersuchung der Wechselwirkung von Modellanalyten und Papier könnten gezielt eingesetzt werden, um deren Retention zu steuern? Wie könnten diese Erkenntnisse eingesetzt werden, um gezielt die Sensitivität und Spezifität im Modellsystem zu erhöhen?
- Inwieweit können die erlangten Erkenntnisse auf komplexe Analyte, wie Proteine, übertragen werden?

2.3. Strategien

Als **Substratmaterial** sollen in dieser Arbeit drei verschiedene Papiersorten: handgebildete Papiere aus Baumwollintersfasern und Eukalyptussulfatfasern sowie kommerziell erhältliches Filterpapier Roth 15A dienen. Den höchsten Reinheitsgrad an Cellulose, was in Bezug auf die potentielle Anwendung in μ PADs erstrebenswert ist, weisen Papier aus Baumwollinters auf. Handgebildete Papier aus Eukalyptussulfatfasern werden zwar ebenfalls ohne Zusätze hergestellt, weisen aber bereits natürlich einen höheren Grad an Verunreinigungen wie Hemicellulose und Lignin auf (Abschnitt 3.1.2). Sie sollten als Vergleichsmaterial für den Einsatz von Holzfaserstoffen in μ PAD-Substraten untersucht werden und wurden bereits von Lappalainen *et al.*^[8] als brauchbares Substratmaterial identifiziert. Kommerziell erhältliches Filterpapier Roth 15A mit einem Flächengewicht von 84 g m^{-2} aus Baumwollintersfasern enthält PAE-Harz als Nassfestmittel.^[61] Es wird verwendet, um die Unterschiede zwischen handgebildeten Papieren und den in der Literatur üblicherweise für μ PADs verwendeten kommerziellen Filterpapieren zu verdeutlichen (Abschnitt 3.1.2).

Garnier *et al.*^[6] (Abschnitt 5.4) nehmen an, dass neben dem Größenausschluss, die selektive Adsorption/Chromatographie aber auch der Ionenaustausch (ionische Wechselwirkung) einen Einfluss auf die Wechselwirkung von Analyten mit Papier haben. Folglich sollen Papiereigenschaften wie Dichte, Porengröße und Porosität anhand von Dicken- bzw. Quecksilberporosimetriemessungen (Abschnitt 4.4) untersucht werden, um den Einfluss des Größenausschlusses auf die Retention von Analyten zu evaluieren. Bei der Charakterisierung der Faserstoffe soll neben der Analyse der chemischen Zusammensetzung ein besonderer Fokus auf die (Oberflächen-) Beschaffenheit der Cellulosefasern gelegt werden, um Adsorptions- und Chromatographieeffekte beurteilen zu können. Dazu sollen neben vergleichenden Elementaranalysen (Abschnitt 4.1.1) und FTIR-Untersuchungen (Abschnitt 4.1.2) auch typische Kennzahlen wie Faserlänge, Feinstoffgehalt oder Fibrillierungsgrad der verwendeten Faserstoffe (Abschnitt 4.2) untersucht werden. Ladungseigenschaften der Faserstoffe werden anhand von Zetapotentialmessungen (Abschnitt 4.3) betrachtet, um den Einfluss ionischer Wechselwirkungen beurteilen zu können.

Zunächst sollen Farbstoffe als **Modellanalyte** untersucht werden, da diese einfach mit dem bloßen Auge kolorimetrisch detektiert werden können. Um den Einfluss ionischer Wechselwirkungen beurteilen zu können, werden als Modellanalyte der negativ geladene Farbstoff Tartrazin (Abschnitt 5.1.1) und als Gegensatz der positiv geladenen Farbstoff Methylenblau (Abschnitt 5.1.2) ausgewählt. Ihre Ladungseigenschaften sollen anhand einer Ladungstitration und UV-VIS-Messungen in Abhängigkeit des pH-Werts untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll anschließend, in Anlehnung an bekannte Verfahren wie Dünnschichtchromatographie oder Papierchromatographie (Abschnitt 3.2.1), eine Vorgehensweise entwickelt werden, die reproduzierbar den Retentionsfaktor der Analyte in Papier als hauptsächliche Vergleichsgröße zur Beurteilung der Retention bestimmt (Abschnitt 3.3). Mit dieser Vorgehensweise soll anschließend die **Wechselwirkung der Modellanalyte mit dem Substratmaterial unter variierenden Parametern der fluiden und soliden Phase** untersucht werden (Kapitel 5). Konkret soll für die Modellfarbstoffe der Einfluss des pH-Werts (Abschnitt 5.2.1), der Leitfähigkeit (Abschnitt 5.2.2) und der Analytkonzentration der fluiden Phase (Abschnitt 5.2.3) auf die Wechselwirkung der Analytmoleküle mit dem Papiersubstrat betrachtet werden. Darüber hinaus wird der Einfluss der soliden Phase in Bezug auf Papierdichte (Abschnitt 5.3.1) und Papiersorte (Abschnitt 5.3.2) untersucht. Anhand der Ergebnisse dieser Messungen sowie der

Charakterisierung der Papiere und Modellanalyten sollen anschließend allgemeine Rückschlüsse auf die zentralen Einflüsse und Mechanismen der Wechselwirkung der Modellanalyte mit dem Papiersubstrat gezogen werden (Abschnitt 5.4).

Basierend auf einem besseren Verständnis der Retention der Farbstoffmoleküle in Papier, soll anschließend anwendungsorientiert versucht werden die Retention der Farbstoffmoleküle gezielt zu steuern, um **μ PADs in Bezug auf Sensitivität und Spezifität zu optimieren**. Zur Steigerung der Sensitivität soll eine ladungsbasierte, ortsspezifische Retention von Tartrazinmolekülen in einem definierten Kanalbereich realisiert werden. So soll die Konzentration der Analyte in diesem Bereich und damit deren "Signal" verstärkt werden. Konkret soll dies realisiert werden, indem positiv geladene Polymere ortsspezifisch in einem definierten Kanalbereich gebunden werden. Diese reternieren und folglich akkumulieren negativ geladene Tartrazinmolekülen, sodass diese auch bei geringen Konzentrationen kolorimetrisch detektiert werden können (Abschnitt 6.3).

Durch eine assayinhärente Aufreinigung von Proben könnte die Spezifität der μ PADs erhöht werden. Konkret soll zur Steigerung der Spezifität die Beobachtung genutzt werden, dass die Leitfähigkeit des Fluids sich unterschiedlich stark auf die Retention der Farbstoffe auswirkt (Abschnitt 5.2.2). Eine ladungsbasierte Auftrennung eines Farbstoffgemischs aus negativ geladenem Tartrazin und positiv geladenem Methylenblau am negativ geladenen Substratmaterial Papier könnte so verstärkt werden.

Schließlich sollen die Untersuchungen auf **komplexere und daher anwendungsnähere Systeme** als Farbstoffmoleküle erweitert werden. Aus herkömmlichen Proteinassays ist beispielsweise bereits bekannt, dass eine selektive Bindung der Analytmoleküle in bestimmten Bereichen angestrebt werden sollte. In den übrigen Bereichen eines Teststreifens sollte hingegen möglichst wenig Protein adhären, um das Signal-Rausch-Verhältnis des Assays und damit seine Sensitivität zu maximieren.^[60] Daher wird das sehr stabile und durch eine Kooperation mit dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Schmitz besonders interessante Protein IL-8 als Modellanalyt für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. Zur Detektion wird es mit TAMRA modifiziert (Abschnitt 7.1). Zunächst wird das Modellprotein in Bezug auf seine Ladungseigenschaften in Abhängigkeit des pH-Werts modelliert (Abschnitt 7.1). Anschließend soll der Einfluss des pH-Werts (Abschnitt 7.2.1) und der Analytkonzentration (Abschnitt 7.2.3), aber auch der Einfluss der Pufferart (Abschnitt 7.2.2) und der Einfluss organischer Lösungsmittel als fluide Phase (Abschnitt 7.2.4) auf die Proteinretention in Papier untersucht werden. Abschließend soll untersucht werden, inwiefern die Modifikation des Substratmaterials mit dem proteinabweisenden Polymer Polydimethylacrylamid (Abschnitt 7.3.1) und *bovine serum albumin* (BSA) (Abschnitt 7.3.2) einen Einfluss auf die Proteinretention hat.

Abbildung 15 fasst die Strategien der vorliegenden Dissertation noch einmal übersichtlich zusammen.

Ausgangspunkt: Verbessertes Verständnis der Retention von Modellanalyten in Papier

- Charakterisierung des Substratmaterials und der Analyte
- Untersuchung der Wechselwirkung von Papier und Analyten bei variierenden Parametern der fluiden & soliden Phase
- Evaluation der Einflüsse & Mechanismen der Wechselwirkungen

Anwendung: Optimierung von μ PADs

- Steuerung der Retention zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität

Erweiterung: Komplexe Systeme (Protein)

Abbildung 15: Strategien der vorliegenden Dissertation im Überblick.

3. Methoden und theoretische Grundlagen

3.1. Von Cellulose zu Papier

Cellulose, als Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände, ist das häufigste organische Molekül der Welt.^[12, 62] Neben Pflanzen stellen auch Algen, Bakterien und Pilze Cellulose her, sodass die natürliche Produktion ca. $1,5 \cdot 10^{12}$ t pro Jahr beträgt. Anwendung findet Cellulose als chemischer Rohstoff z.B. für Derivate wie Celluloid und Viskose bereits seit über 150 Jahren. Für die Papierherstellung sind Cellulosefasern der zentrale Rohstoff.^[63] Daher soll im Folgenden zunächst deren Struktur, Eigenschaften und Gewinnung mit Fokus auf die verwendeten Fasertypen Baumwolllinters und Eukalyptussulfat beschrieben werden. Im Anschluss wird das Material Papier selbst genauer betrachtet, bevor schließlich auf den Fluidtransports in Papier genauer eingegangen wird.

3.1.1. Aufbau und Eigenschaften von Cellulose(fasern)

Papier ist ein zufällig verflochtenes Cellulosefasernetzwerk (Abbildung 16).^[12, 62] Seine physikochemischen Eigenschaften als Grundlage für die verschiedensten Anwendungen liegen u.a. auch im strukturellen Aufbau der (Papier)fasern begründet. Der hierarchische Aufbau der Papierfasern umfasst drei Ebenen. Die molekulare Stufe beschreibt die chemische Struktur und Eigenschaften des einzelnen Makromoleküls. Die supramolekulare Stufe definiert die Anordnung der Makromoleküle basierend auf deren Wechselwirkungen untereinander. Die morphologische Stufe legt den Aufbau komplexer Struktureinheiten dar.^[12, 14]

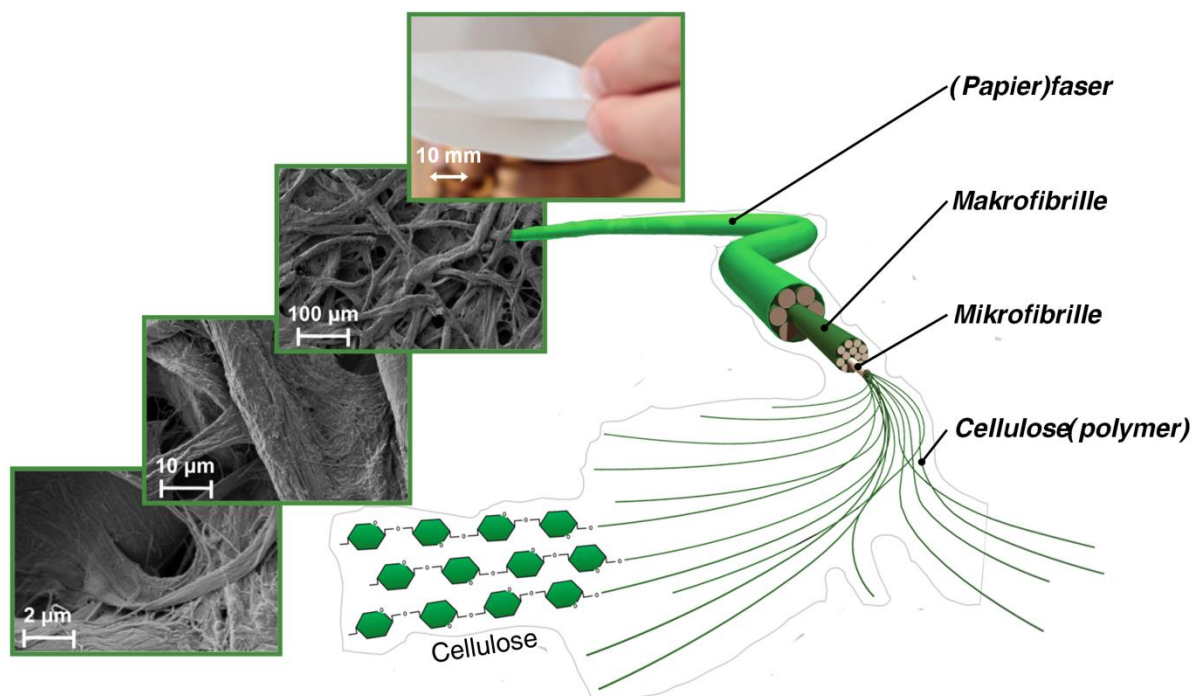


Abbildung 16: Papier ist ein zufällig verflochtenes Netzwerk von Cellulosefasern, was die REM-Aufnahmen von Whatman No.1 Chromatographiepapier aus Costa *et al.*^[64] verdeutlichen. Cellulosefasern entstehen durch die strukturierte Zusammenlagerung einzelner Cellulosepolymere zu Mikro- und Makrofibrillen (Graphik nach ^[65]).

Molekulare Stufe: Cellulose

Wie 1838 von Payen entdeckt, besteht Cellulose zu 44–45 % aus Kohlenstoff, 6–6,5 % aus Wasserstoff und der verbleibenden Menge Sauerstoff. Folglich kann auf eine Summenformel von $C_6H_{10}O_5$ geschlossen werden.^[66] Auf molekularer Ebene ist Cellulose ein syndiotaktisches Polyacetal mit D-Glucose als Monomereinheit. Die β -D-Anhydroglucopyranose-Einheiten sind alternierend um 180° gedreht, kovalent über Acetalfunktionen zwischen den äquatorialen C_1 - und C_4 -Atomen der Monomereinheiten verknüpft.^[12, 63, 67] Thermodynamisch begünstigt ist dabei die 4C_1 -Sesselform mit äquatorial ausgerichteten Hydroxylgruppen. Dies ermöglicht intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe an C_3 und dem Sauerstoffatom des benachbarten Pyranoserings sowie den Hydroxylgruppen an C_6 und C_2 der benachbarten Glucoseeinheiten (Grün in Abbildung 17). Diese Wasserstoffbrückenbindungen sorgen für eine gesteigerte Kettensteifigkeit.^[14, 66] Der Polymerisationsgrad der Cellulose variiert stark mit Quelle und Aufbereitungsart (aufbereitete Baumwolllinters meist 800–1800^[12]; Holzzellstoff meist 300–1700^[14]). In jedem Fall ist natürliche Cellulose polydispers.^[14, 66] Glucose ist wasserlöslich. Das Polymer ist es bereits ab einem Polymerisationsgrad von 6, aufgrund der starken intra- und intermolekularen Wechselwirkungen, nicht mehr wasserlöslich.^[14]

Supramolekulare Stufe: Wechselwirkung der Cellulosemoleküle

Neben intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen können zwei nebeneinander liegende Cellulosemoleküle auch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen an C_6 und C_3 der benachbarten Ketten (Rot in Abbildung 17) ausbilden. Diese Kohäsion zwischen den einzelnen Molekülketten führt zu einer hohen räumlichen Ordnung der gestreckten Ketten, die es ermöglicht, dass sich kristalline Strukturen ausbilden.^[14]

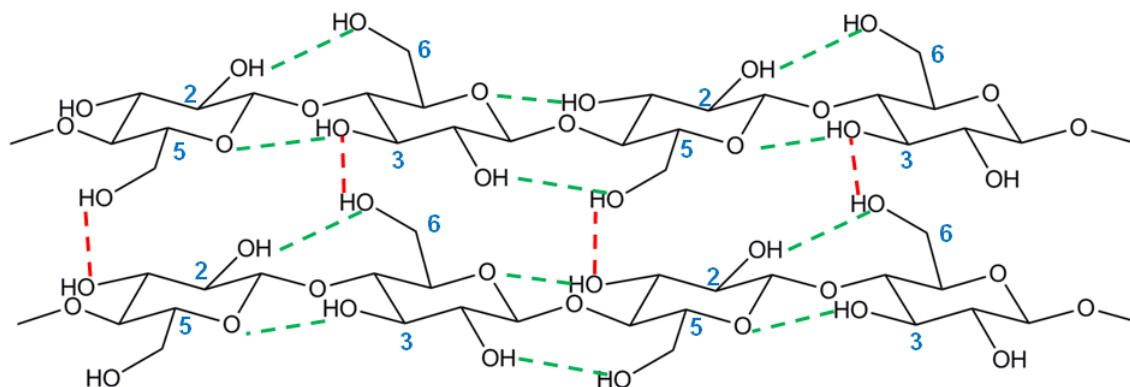


Abbildung 17: Supramolekulare Struktur von Cellulose I. In Grün intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe an C_3 und dem Sauerstoffatom des benachbarten Pyranoserings sowie der Hydroxylgruppen an C_6 und C_2 der benachbarten Glucoseeinheiten. In Rot intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen an C_6 und C_3 von benachbarten Ketten (nach Roy *et al.*^[67]).

In diesen kristallinen Bereichen bilden zwei parallel orientierte Cellulosemoleküle wie ursprünglich von Meyer, Mark und Misch postuliert eine monoklinale Elementarzelle der Raumgruppe $P2_1$.^[63, 66] Nach dem Frasenfibrillarmodell sind diese kristallinen, hoch geordneten Bereiche (Kristallite) von amorphen Bereichen umgeben (Abbildung 18). Da eine Polymerkette meist durch mehrere Kristallite sowie amorphe Bereiche verläuft, entsteht ein stark verbundenes Netzwerk von Cellulosemolekülen. Das Verhältnis von kristallinen und amorphen Bereichen ist abhängig von Quelle und Vorbehandlung der Cellulose. Baumwolllinters beispielsweise weisen mit 65–70 % einen relativ hohen kristallinen Anteil auf.^[12, 14, 66]

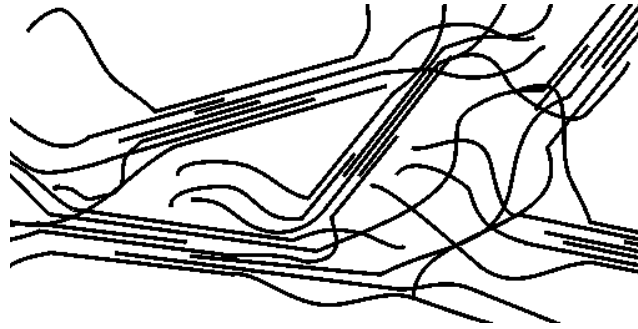


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Netzwerks aus Cellulosemolekülen nach dem Frasenfibrillarmodell (nach Krässig *et al.*^[66]).

Cellulose kann in fünf verschiedenen allomorphen Formen vorliegen, die anhand ihrer Wasserstoffbrückenbindungen und Elementarzellen zu unterscheiden sind.^[67] Die natürliche, meist verbreitete Form ist Cellulose I. Sie liegt meist als Mischung aus Cellulose I_α und I_β vor. Cellulose I_β ist dabei die thermodynamisch stabile, in Pflanzen überwiegend vertretene und daher für die Papierherstellung relevante Form. Cellulose I_α wird hauptsächlich von Bakterien und Algen produziert.^[12] Großtechnisch relevant ist darüber hinaus die künstlich erzeugte Form Cellulose II (regenerative Cellulose). Die allomorphe Cellulose III und IV treten selten auf.^[14]

Morphologische Stufe: Aufbau der Fasern

Die beschriebenen Strukturen bilden Mikrofibrillen und Makrofibrillen und schließlich in Verbindung mit Begleitstoffen wie Hemicellulose, Lignin oder Pektinen und Wachsen Cellulosefasern aus. Dazu lagern sich die Fibrillen in den einzelnen Zellwandschichten unter spezifischem Einbau der Begleitstoffe in charakteristischen Orientierungen und Strukturen zusammen (Abbildung 19). Die Struktur der Fasern unterscheidet sich abhängig von Zellwandschichten und Pflanzenart.^[63] In Abbildung 19 ist vergleichend der Aufbau einer Baumwoll- und einer Fichtenholzfaser dargestellt. An das Lumen (L), von dem aus die äußeren Schichten der Fasern aufgebaut werden, schließt sich in der Baumwollfaser direkt die Sekundäre Zellwand (S) an. In der Holzfaser folgt zunächst die Tertiäre Zellwand (T) vor der Sekundären Zellwand. In beiden Fasertypen ist die S₂-Schicht die dickste Schicht mit dem höchsten Anteil an reiner Cellulose. Die S₁-Schicht geht ebenso wie die flexible, wasserunzugängliche Primäre Zellwand (P) mit einem hohen Anteil an Pektin, Protein, Mineralien und Wachs bei der Zellstoffherstellung verloren.^[68] Die Baumwollfaser als Einzelfaser weist zusätzlich die Cuticula (C), eine Schicht besonders reich an Pektinen und Wachsen, auf. Da Holzfaserbündel vorliegen, sind sie durch die ligninreichen Mittellamellen verbunden.^[12, 66-67]

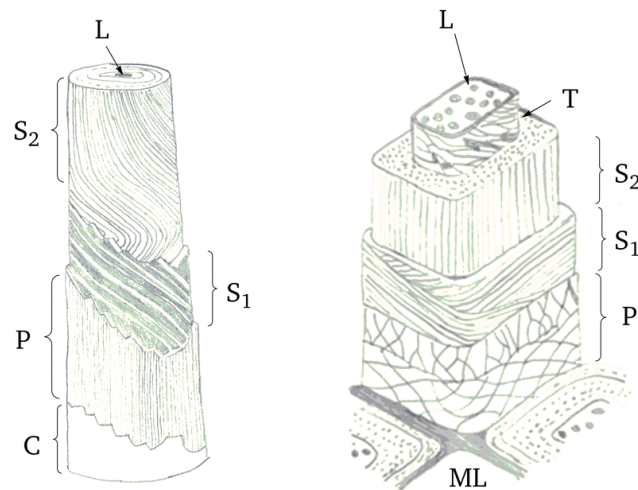


Abbildung 19: Schematische Darstellung der morphologischen Struktur einer Baumwollfaser (links) und Fichtenholzfaser (rechts). Die Baumwollfaser ist schichtweise aus der Cuticula (C), der Primären Zellwand (P), den beiden Schichten der Sekundären Zellwand (S_1 und S_2) und dem Lumen (L) aufgebaut. Die Fichtenholzfaser besteht aus der Primären Zellwand (P), den beiden Schichten der Sekundären Zellwand (S_1 und S_2), der Tertiären Zellwand (T) sowie Lumen (L). Die Fichtenholzfaser ist durch die Mittellammellen (ML) verbunden. Mit Lizenz von *Creative Commons License Deed* (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) unverändert übernommen aus Ott (2017).^[69]

Eigenschaften von Cellulose(fasern) mit Fokus auf Faserquellung

Der beschriebene Aufbau der Cellulosefasern ist für die meisten charakteristischen Eigenschaften verantwortlich. So weisen Cellulosefasern beispielsweise eine relativ hohe Bruchkraft bei mittlerer Steifigkeit und einer geringen Dichte auf. Unter Berücksichtigung der geringeren Dichte, erreichen Baumwolllinter dabei Werte ähnlich wie Glasfasern (Tabelle 1).^[12, 63] Die Cellulosefasern sind thermisch sehr stabil, denn sie behalten Struktur und mechanische Eigenschaften bis zu einer Temperatur von ca. 200 °C. Die starken zwischenmolekularen Wechselwirkungen des Materials sorgen oberhalb dieser Temperatur für eine thermische Zersetzung ohne vorheriges Schmelzen. Trockene Cellulose ist darüber hinaus mit einem spezifischen Widerstand von $10^{18} \Omega$ ein guter Isolator, dessen Qualität allerdings mit zunehmendem Wasseranteil stark abnimmt.^[14]

Tabelle 1: Vergleich mechanischer Eigenschaften von Baumwolllinterfasern und Glasfasern.^[12]

	Dichte [g cm ⁻³]	Bruchkraft [MPa]	Steifigkeit [GPa]
Baumwolllinter	1,5-1,6	287-597	5,5-12,6
Glasfasern	2,54	2200	70

Das nahezu inerte Material ist unlöslich in Wasser mit neutralem und leicht alkalischem Charakter sowie einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln. Allerdings quellen die Strukturen zumeist in diesen Medien, d.h. die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Cellulosemolekülen werden teilweise durch die Wechselwirkung der Cellulose mit Lösungsmittelmolekülen ersetzt. Eine Volumenzunahme durch Einlagerung des Lösungsmittels ist die Folge. Dies erfolgt aufgrund des strukturellen Aufbaus der Fasern hauptsächlich lateral (im Querschnitt) während die Länge der Fasern nahezu konstant bleibt.^[14] Es lassen sich zwei Arten der Quellung unterscheiden: Interkristalline und intrakristalline Quellung. Bei der interkristallinen Quellung erreichen die Lösungsmittelmoleküle nur die leicht zugänglichen, amorphen Bereiche, während bei der

intrakristallinen Quellung auch die Kristallite durchdrungen werden. Da die Kristallite nur unter besonderen Bedingungen, wie z.B. mit bestimmten Salzen in stark alkalischer Lösung, aufgebrochen werden können, ist für diese Arbeit nur die interkristalline Quellung relevant.^[70] Eine allgemeine Korrelation von Lösungsmittleigenschaften und Quellverhalten ist nicht zu beobachten. Allerdings scheint die Quellungskraft eines Lösungsmittels mit einer hohen Affinität zur Wasserstoffbrückenbildung besonders ausgeprägt zu sein. Experimentell wurde für die Quellung von Baumwolllinters eine abnehmende Quellungskraft der folgenden Lösungsmittels festgestellt: DMSO > Wasser > DMF > Essigsäure > Ethanol > n-Hexan.^[14] Bei der Betrachtung von Wasser als Lösungsmittel wurde festgestellt, dass eine niedrige Temperatur sowie schwach basische Lösungen und Salze die Quellung der Fasern forcieren.^[71] Während des Quellungsprozesses der Cellulosefasern in Wasser kann eine kleine Menge Wasser in die Zellwand der Fasern aufgenommen werden. Das konkrete Volumen ist dabei abhängig von Parametern wie der Holzart, der Verarbeitung oder dem Mahlgrad und wird anhand des Faserfeuchtigkeitssättigungspunkts (FSP) quantifiziert. Dieser setzt die Masse des aufgenommenen Wassers $m(\text{Wasser})$ ins Verhältnis zum Trockengewicht der gequollenen Fasern $m(\text{Faser, trocken})$ (Gleichung 1). Dieses meist als "gebunden" bezeichnete Wasser, weist besondere Eigenschaften auf. Beispielsweise gefriert es nicht und ist nicht zugänglich für gelöste Salze und andere niedermolekulare Verbindungen.^[70]

$$FSP = \frac{m(\text{Wasser}) \text{ in g}}{m(\text{Faser, trocken}) \text{ in g}} \quad (1)$$

Typische Literatur bekannte Werte reichen von $0,12 \text{ g g}^{-1}$ ^[70] als Durchschnittswert für Baumwolllinters bis zu $1,41 \text{ g g}^{-1}$ ^[66] für Baumwolllinters gequollen in 12 molarer Natronlauge. Fichtenholz-Kraft-Zellstoff erreicht abhängig von der Verarbeitung sogar Werte bis zu $2,18 \text{ g g}^{-1}$ ^[66].

3.1.2. Gewinnung und spezifische Eigenschaften von Baumwollinters- und Eukalyptussulfatfasern

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Fasertypen zur Blattbildung verwendet. Einerseits der in der Papierindustrie weit verbreiteter Zellstoff Eukalyptussulfat und andererseits der aufgrund seiner hohen Reinheit in spezifischen Anwendungen wie z.B. Filterpapieren verwendete Zellstoff Baumwollinters. Im Folgenden sind Zellstoffgewinnung und daraus resultierende für diese Arbeit besonders relevante Eigenschaften der Zellstoffe beschrieben.

Eukalyptussulfatfasern

Eukalyptus zählt zur Gruppe der Laubhölzer, die lediglich zu 41–46 % aus Cellulose bestehen. Über die Hälfte des Materials besteht aus Hemicellulose, Lignin und anderen Begleitstoffen.^[72] Es sind verschiedene Verfahren zur Abtrennung der Begleitstoffe aus Holz bekannt. Zur Gewinnung von Eukalyptussulfatfasern wird das Sulfatverfahren ("kraft pulping") eingesetzt.

Im Sulfatverfahren erfolgt ein chemischer Aufschluss der Fasern mittels Natronlauge und Natriumsulfid bei erhöhter Temperatur. Der Abbau der Begleitstoffe erfolgt hauptsächlich durch nukleophile Angriffe der Sulfidionen, wodurch die unlöslichen Stoffe löslich werden und als Schwarzlauge abgetrennt werden können. Die alkalische Kochung mit Natriumsulfid führt zu einer Reihe von unerwünschten Nebenreaktionen. Beispielsweise werden die Celluloseketten, vom reduzierenden Kettenende ausgehend, durch die Einwirkung der Lauge abgebaut ("Peeling-Reaktion"). Diese Reaktion verkürzt die Celluloseketten, kann aber durch die Bildung einer Metasaccharinsäure abgebrochen werden (Abbildung 20).^[10]

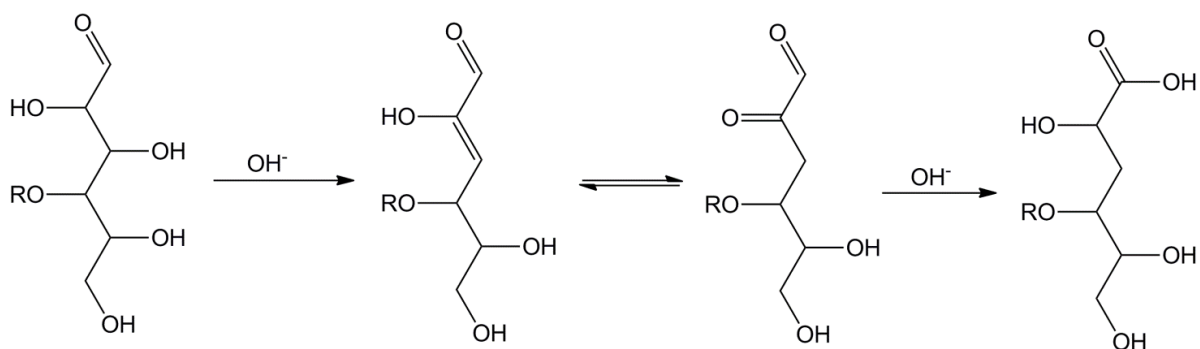


Abbildung 20: Bildung der Metasaccharinsäure als Stoppreaktion der "Peeling-Reaktion" (nach Blechschmidt^[10]). R steht für die Cellulosekette.

Um die Cellulosemoleküle nicht zu stark anzugreifen, muss die Aufreinigung abgebrochen werden, bevor das Lignin vollständig entfernt werden kann. Dies hat zur Folge, dass ein erhöhter Restligninanteil im Zellstoff, der auch durch anschließende Bleiche nicht vollständig entfernt werden kann, verbleibt.^[10]

Gereinigte Eukalyptussulfatfasern haben durchschnittlich eine Länge von 1,1 mm bei einem Durchmesser von 20 μm .^[73] Der gereinigte Faserstoff weist üblicherweise eine anionische Oberflächenladung auf. Diese beruht entweder auf Uronsäuren als nicht vollständig entfernte Reste der Hemicellulosen oder wird während des Aufschlussprozesses z.B. durch die oben beschriebene Nebenreaktion eingeführt. Die Ausprägung der Ladung ist neben verschiedener Prozessparametern vor allem vom pH-Wert und der Leitfähigkeit der Zellstoffsuspension abhängig.^[74] Garcia *et al.*^[75] untersuchten das Zetapotential von Eukalyptussulfatzellstoffsuspension in Abhängigkeit vom pH-Wert bei konstanter Leitfähigkeit (Abbildung 21).

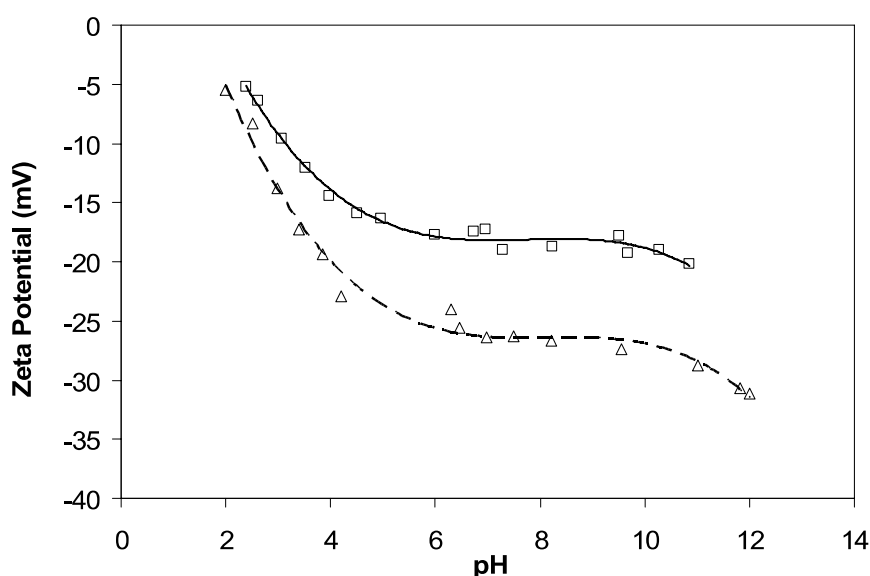


Abbildung 21: Auftragung des mittels Strömungspotentialmessungen ermittelten Zetapotentials von Eukalyptussulfatzellstoffsuspension bei verschiedenen pH-Werten und zwei verschiedenen Leitfähigkeiten (Dreieck: 2 mS cm^{-1} , Quadrat: 4 mS cm^{-1})^[75]. Von pH 2 bis 5 nimmt die negative Ladung stark zu. Nach einem Plateaubereich (pH 5–8) nimmt das Zetapotential bei pH 12 weiter ab.^[75]

Baumwolle

Baumwolle ist das einzige Pflanzensamenhaar mit kommerzieller Bedeutung. Während die langen Lintfasern (>2 cm) der Textilindustrie als Ausgangsmaterial dienen, werden die kürzeren Lintersfasern zur Umsetzung in Cellulosederivate verwendet. Darüber hinaus dienen sie der Papierindustrie als Rohstoffquelle für Spezialpapiere.^[76]

Die Besonderheit von Baumwollfasern ist ihr hoher Anteil an reiner Cellulose.^[14, 66] Rohlinters enthalten neben dem Hauptbestandteil Cellulose (73 %) noch Begleitstoffe wie Fette, Pektine und Proteine (Abschnitt 3.1.2) sowie Verunreinigungen wie Sand oder Samenschalen. Zur Gewinnung der reinen Cellulose erfolgt zunächst eine mechanische Aufreinigung, bei der die groben Verunreinigungen abgetrennt werden. Durch den anschließenden alkalischen Aufschluss unter Druck bei erhöhter Temperatur werden Begleitstoffe sowie die primäre Zellwand und teilweise die S_1 -Schicht in lösliche Abbauprodukte umgewandelt und als Schwarzlauge ausgespült. Häufig werden die Fasern anschließend vor der Trocknung gebleicht.^[14, 76]

Gereinigte Lintersfasern sind bei einem Durchmesser von $17\text{--}27\text{ }\mu\text{m}$ üblicherweise $2\text{--}6$ mm lang und damit deutlich länger als Eukalyptussulfatfasern. Sie bestehen zu >99 % aus reiner α -Cellulose und weisen folglich nahezu keinen Restlignin- und Hemicellulosegehalt auf. Daher ist Papier aus Baumwolllinterszellstoffsuspension besonders gut für diagnostische Anwendungen geeignet.^[33] Auch für Baumwolllintersfasern wird eine anionische Oberflächenladung erwartet. Laut Literatur^[77] wird ein Anteil von $<0,4$ mmol pro 100 g Zellstoff an Carboxylgruppen erwartet. Das Zetapotential der Zellstoffsuspension in Abhängigkeit des pH-Werts und der Leitfähigkeit wurden von Herrington *et al.*^[78] untersucht (Abbildung 22).

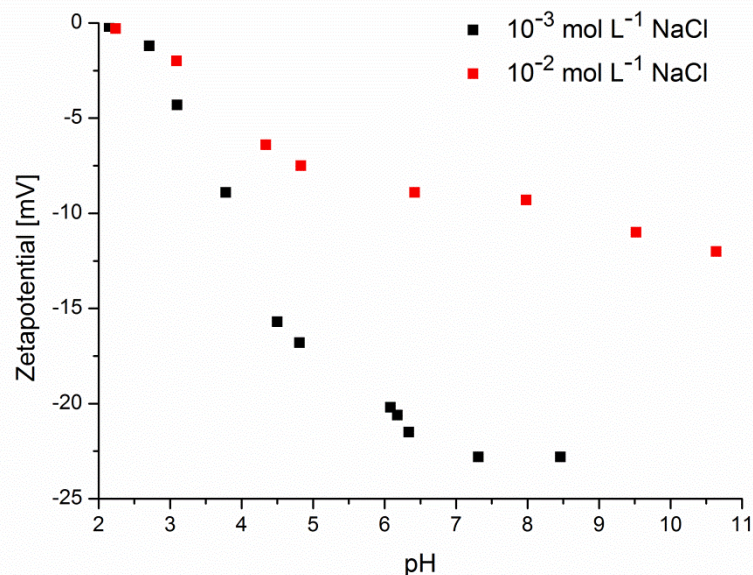


Abbildung 22: Auftragung des mittels Strömungspotentialmessungen ermittelten Zetapotentials von Baumwolllinters bei verschiedenen pH-Werten und zwei verschiedenen Konzentrationen Natriumchlorid (Daten aus Herrington *et al.*^[78]). Bis zu einem pH-Wert von etwa pH 5–6 nimmt das Zetapotential ab, bevor es einen relativ konstanten Wert erreicht.

3.1.3. Papier

Papier besteht aus einem Fasernetzwerk zufällig verwobener Cellulosefasern, Faserfragmente und Feinstoffe. Ursprünglich im 2. Jahrhundert nach Christus in China erfunden, ist Papier heutzutage

mit einer weltweiten Jahresproduktion (2015) von 400 Mio Tonnen ein großindustriell hergestelltes Produkt. Es findet Anwendungen z.B. als graphisches Papier, Verpackungsmaterial, Tissue- und Dekorpapier oder in Form von Spezialpapieren wie Sicherheits- oder Filterpapier. In dieser Arbeit soll es als Substrat für *Lab-on-a-chip*-Systeme untersucht werden.^[10, 12, 68, 79]

Papier entsteht, wenn eine Zellstoffsuspension durch Pressen auf ein Sieb und anschließende Trocknung entwässert wird. Während dieses Prozesses bilden sich neue Bindungen zwischen den Cellulosefasern aus, die das Papier zusammen halten.^[12] Ein Aspekt der Stabilität sind dabei die Charakteristika der einzelnen Fasern wie Länge, Durchmesser, Mahlgrad oder Bruchkraft der Einzelfaser. Die Bruchkraft des Fasernetzwerkes nimmt beispielsweise mit der Faserlänge zu. Auch eine mäßige Mahlung erhöht die Stabilität aufgrund einer höheren Faserflexibilität und Auffaserung, die mehr Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Fasern bieten. Diese relevanten Charakteristika der einzelnen Fasern können in einer Faseranalyse untersucht werden. Darüber hinaus spielt die meist prozessbedingte Anordnung der Fasern im Netzwerk eine Rolle. Während in handgebildeten Papieren die Fasern isotrop verteilt sind, weisen maschinell hergestellte Papiere oft eine Vorzugsrichtung der Fasern auf. Schließlich ist die Bindungsart und -zahl der Faserwechselwirkungen im Bereich der Faserkreuzungspunkte entscheidend für die Papierstabilität. Am wichtigsten ist der Einfluss der Wasserstoffbrückenbindungen. Einen zusätzlichen Beitrag zur Bindung der Fasern liefern ladungsbasierte Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und die Verschlaufung der Polymerketten. Eine höhere Anzahl an Faserkreuzungspunkten erhöht dabei die Stabilität.^[68, 74a, 80]

Zentral für die Charakterisierung von Papieren ist das Flächengewicht A . Es ist definiert als die Masse an Papier pro Fläche. Ein zweiter wichtiger Parameter ist die Papierdicke s . Diese nimmt z.B. einen Einfluss auf die Menge an Fluid, die ein Papier maximal aufnehmen kann. Flächengewicht und Papierdicke definieren die Papierdichte ρ (Gleichung 2).^[4, 68]

$$\rho \left[\frac{kg}{m^3} \right] = \frac{A \left[\frac{g}{m^2} \right]}{s \left[\mu m \right]} \cdot 1000 \quad (2)$$

Papier weist eine poröse Struktur auf, wodurch es Licht streut und opak erscheint. Darüber hinaus beeinflusst die Papierstruktur die Wechselwirkung mit Fluiden (Abschnitt 3.1.3) sowie die mechanischen Eigenschaften. Charakterisiert werden die Poren im Papier durch den mittleren Porenradius und die Porosität P (Gleichung 3). Sie ist definiert als das mittlere Porenvolumen (V) pro Gesamtvolumen der Probe (V_{ges}). Beides wird üblicherweise mittels Quecksilberporosimetrie quantifiziert.^[4, 26, 68]

$$P = \frac{V}{V_{ges}} \quad (3)$$

Neben den faserhaltigen Rohstoffen kommen in der kommerziellen Papierherstellung üblicherweise zusätzlich mineralische Rohstoffe, wie Füllstoffe und Pigmente, sowie chemische Additive zum Einsatz. Additive werden abhängig von ihrer Anwendung in zwei Gruppen unterteilt. Prozessadditive kommen mit dem Ziel zum Einsatz den Papierherstellungsprozess effizienter zu gestalten und so die Produktivität zu steigern. Funktionelle Additive variieren hingegen gezielt die Eigenschaften des fertigen Papierprodukts, um sie für verschiedene Anwendungen zu optimieren.^[10] Für diese Arbeit sind aus dem Bereich der funktionellen Additive besonders Farbstoffe und Nassfestmittel relevant und werden im Folgenden genauer betrachtet.

Farbstoffe als Additive

Die am weitesten verbreitete Methode zum Färben von Papier ist die Färbung in Masse (90–95 % der Gesamtproduktion gefärbter Papiere).^[81] Dabei wird der in Wasser gelöste Farbstoff "ausgezogen" und auf oder in den Papierfasern verankert.^[10] Die zentralen Schritte dieses Prozesses sind das Eindringen der Farbstoffmoleküle in die Zwischenräume der Cellulosefasern und ihre Adsorption an der Faseroberfläche.^[82] Abhängig von der Art des Farbstoffs (Pigmente werden an dieser Stelle nicht angeführt) sind dabei Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte oder ionische Wechselwirkungen die zentrale Kraft.^[83]

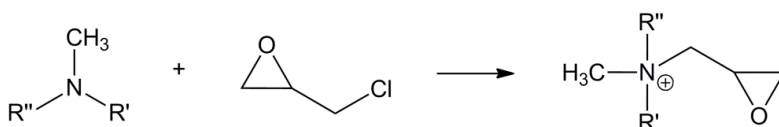
Direktfarbstoffe (substantive Farbstoffe) weisen aufgrund ihrer linearen Molekülstruktur und dem konjugierten Doppelbindungssystem intrinsisch eine hohe Affinität zu Cellulosefasern auf.^[82] Ihre Wechselwirkung beruht entweder auf Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zu Seitengruppen wie Hydroxy- oder Amingruppen der langgestreckten coplanaren Strukturen der Farbstoffmoleküle ausbilden, oder auf Wechselwirkungen des aromatischen π -Systems der Farbstoffmoleküle mit den Hydroxylgruppen der Cellulose.^[83] Bei kationischen Direktfarbstoffen sind auch ionische Wechselwirkungen der Moleküle mit der Papierfaser häufig. Üblicherweise weisen (besonders kationische) Direktfarbstoffe bereits ohne die Verwendung von Fixiermittel ein gutes Aufziehverhalten und eine gute Wasserechtheit auf.^[10]

Bei nicht-substantiven Farbstoffen wird zwischen basischen und sauren Farbstoffen unterschieden. Basische Farbstoffe enthalten üblicherweise Aminogruppen, die im sauren oder neutralen protoniert und folglich positiv geladen sind.^[10] Sie besitzen vor allem auf ligninhaltige Faserstoffe ein gutes Aufziehvermögen und durch die Bildung von Salzbrücken eine hohe Affinität.^[84] Als saure Farbstoffe werden Azofarbstoffe bezeichnet, die meist als Alkalisalze von Sulfonsäuren vorliegenden. Aufgrund der Sulfonatgruppen sind sie im basischen und neutralen pH-Bereich negativ geladen.^[10] Trotz ihrer guten Wasserlöslichkeit und ihres guten Penetrationsvermögens in die Cellulosefasern werden sie aufgrund ihrer Ladung dauerhaft nur durch kationische Fixierungsmittel an der Faser gebunden.^[84] Im Gegensatz zu anionischen Direktfarbstoffen sind sie meist kleiner und weisen kein konjugiertes Doppelbindungssystem auf.^[82]

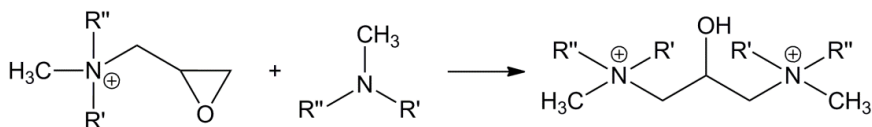
Nassfestmittel als Additive

Wasserstoffbrücken sind für den Zusammenhalt von Cellulosefasern im Papier essentiell. Durch Kontakt mit Wasser werden diese aufgelöst und die Festigkeit des Papiers sinkt auf deutlich unter 10 % der Trockenfestigkeit.^[74a] Nassfestigkeit ist für die Anwendung von Papieren in Bereichen, in denen sie mit Flüssigkeit in Kontakt kommen, z.B. als Lebensmittelverpackungen, Filter- oder Hygienepapiere, wichtig. Daher verbrücken Nassfestmittel mehrere Cellulosefasern im Papier meist kovalent, um diese auch nach Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen durch Feuchtigkeit zusammenzuhalten. So können zumindest 10–30 % der Trockenfestigkeit eines Papiers erhalten bleiben.^[74a, 83] Üblicherweise werden die zwar hydrophoben aber trotzdem meist wasserlöslich oder zumindest dispergierbaren Stoffe bei der Blattbildung zugegeben und reagieren durch die hohen Temperaturen bei der Trocknung.^[10] Dabei können sie einerseits untereinander vernetzen und so die Faserkreuzungspunkte stabilisieren und andererseits Bindungen zu den Cellulosefasern ausbilden.^[74a, 84] Typische Nassfestmitteln sind Polyamin-Epichlorhydrinharz (PAE-Harz) oder auch Polyamidoamin-Epichlorhydrinharz (PAAE-Harz) genannt, Melamin-Formaldehydharz (MF) oder Harnstoff-Formaldehydharz (UF).^[84] In Abbildung 23 ist beispielhaft die Selbst- bzw. Fremdvernetzung eines PAE-Harzes durch Erwärmung im Trocknungsprozess dargestellt.

Bildung der reaktiven Spezies



Selbstvernetzung



Fremdvernetzung

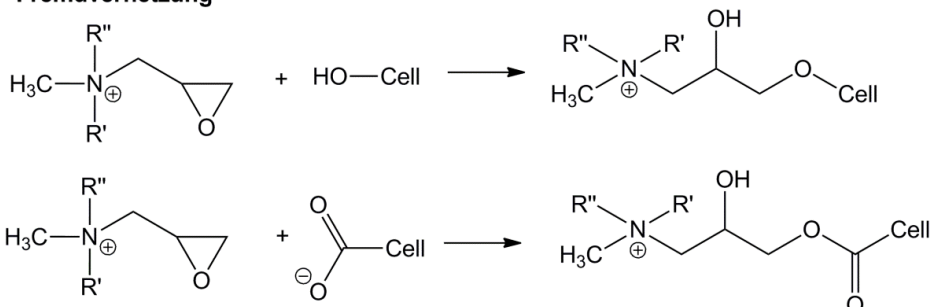


Abbildung 23: Reaktion eines PAE-Harzes zur Herstellung von nassfesten Papieren. Eine Dicarbonsäure reagiert mit einem Diamin in einer Polykondensation zu wasserlöslichem Aminopolyamid. Die Amingruppe dieser Vorstufe reagiert anschließend mit Epichlorhydrin zu einer positiv geladenen, reaktiven Form, die bei neutralem oder alkalischem pH-Wert und erhöhter Temperatur durch Kondensation Selbst- oder Fremdvernetzen kann.^[85]

Beim Einsatz von Papieren mit Nassfestmitteln für μ PADs können diese den Transport von Analyten beeinflussen. Positiv geladene PAE-Polymere können beispielsweise mit negativ geladenen Analyten, wie Proteine^[9] oder DNA^[86], wechselwirken und so Testergebnisse verfälschen. Umgekehrt können Nassfestmittel auch einen positiven Einfluss auf beispielsweise die Bioaktivität von Antikörpern in μ PADs haben.^[87] Daher sollten Nassfestmittel in Papieren für *Lab-on-chip*-Systeme generell kritisch betrachtet werden.

3.1.4. Fluidtransport in Papieren

Der Fluidtransport in Papier ist ein komplexer Vorgang, in dem verschiedene Phänomene eine Rolle spielen: Benetzung, Transport, Verdampfung und Diffusion.^[6]

Tritt eine Flüssigkeit mit einer Papieroberfläche in Kontakt, benetzt die Flüssigkeit zunächst die Oberfläche. Der Grad der *Benetzung* wird dabei physikalisch üblicherweise durch den Kontaktwinkel an der Flüssigkeits-Faser-Grenzfläche beschrieben. Zur Beschreibung des Kontaktwinkels einer Flüssigkeit auf einer Oberfläche sind, abhängig von der Art der Benetzung, verschiedene Modelle bekannt. Die Benetzung von Papier mit einem wässrigen Fluid beschreibt die Hofmann-Tanner-Gleichung anschaulich und im Rahmen des Modells ausreichend.^[6] Sie stellt eine Proportionalität der Kapillarzahl Ca und des Kontaktwinkels θ für eine vollständige bzw. partielle Benetzung her (Gleichung 4b bzw. 4c). θ_e ist dabei der durch die Young-Gleichung (Gleichung 4a) definierte statische Kontaktwinkel im Gleichgewichtszustand mit γ_{SV} als Oberflächenspannung zwischen Faser

und Dampf, γ_{SL} als Oberflächenspannung zwischen Faser und Flüssigkeit und γ als Oberflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Gasphase.^[88]

$$\text{Young-Gleichung} \quad \cos \theta_e = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma} \quad (4a)$$

$$\text{vollständige Benetzung } (\theta_e = 0): \quad \theta^3 \sim Ca \quad (4b)$$

$$\text{partielle Benetzung } (0 < \theta_e < 90^\circ): \quad \theta^3 - \theta_e^3 \sim Ca \quad (4c)$$

Da die Kapillarzahl nach Gleichung 5 definiert ist, resultiert eine geringe Viskosität μ der Flüssigkeit und eine höhere Oberflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Gasphase γ in einer höheren Benetzungsgeschwindigkeit u . Dieses Wissen kann beispielsweise genutzt werden, um die Benetzungsgeschwindigkeit gezielt einzustellen.^[6]

$$Ca = \frac{\mu \cdot u}{\gamma} \quad (5)$$

Sobald das Fluid das Papier benetzt hat, kommt es in einem Zeitrahmen von Sekunden bis Minuten zur *Absorption bzw. dem passiven kapillarkraftgetriebenen Transport des Fluids* durch die Faserzwischenräume im Papier. Der Kapillarttransport resultiert aus einem Wechselspiel von kohäsiven Kräften des Fluids, wie z.B. der Oberflächenspannung, und adhäsiven Kräften zwischen Flüssigkeit und Fasern.^[89] Die für den Fluidtransport verantwortliche Kraft wird als Kapillardruck p_c bezeichnet. Er entsteht an der Fest/Flüssig-Phasengrenze aufgrund des Unterschieds der Oberflächenenergie von Papiermatrix und Fluid. Ein Transport kann beobachtet werden, wenn die Adhäsion der Moleküle der fluiden und soliden Phase größer ist als die Anziehung der Moleküle in der fluiden Phase untereinander. Der Kapillardruck ist definiert durch die Young-Laplace-Gleichung (Gleichung 6). Im Fall des Flüssigkeitstransports durch Faserzwischenräume des Radius R_c kann die Flüssigkeit als benetzendes Fluid (w) und die Gasphase als nichtbenetzendes Fluid (nw) bezeichnet werden (Abbildung 24).^[90]

$$\text{Young-Laplace-Gleichung:} \quad p_c = p_{nw} - p_w = \frac{2\gamma \cos \theta}{R_c} \quad (6)$$

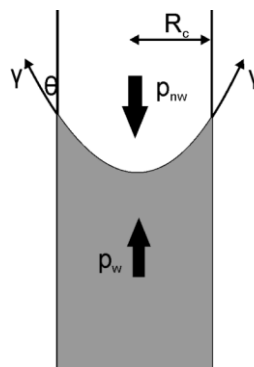


Abbildung 24: Kräftegleichgewicht an der Fluidfront in einem Kapillarrohr (nach Masoodi *et al.*^[90]).

Klassisch wird der Fluidtransport vereinfacht mit der Lucas-Washburn-Gleichung (Gleichung 7) beschrieben. Hierbei ist die zurückgelegte Strecke x proportional zur Wurzel der Fließzeit t . Die Gleichung wurde ursprünglich für die Beschreibung des Fluidtransports in einem Bündel paralleler, zylindrischer Röhren entwickelt. In der Anwendung der Gleichung auf den Fluidtransport in Papier

ist die von der Flüssigkeitsfront zurückgelegte Strecke durch die Oberflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Luft γ , den effektiven Porenradius der Papiermatrix, den Kontaktwinkel zwischen Flüssigkeit und Faser θ und die Fluidviskosität μ gegeben.^[6, 89] Für eine ausführliche Herleitung der Gleichung wird auf Masoodi *et al.*^[90] verwiesen.

$$x(t) = \sqrt{\frac{\gamma r \cos \theta}{2\mu}} t \quad (7)$$

Um dieses einfache Modell auf den Fluidtransport in Papier zu übertragen, müssen einige Näherungen angenommen werden. Ein gleichmäßiger Querschnitt des Papiers ohne jegliche Verunreinigungen, einheitliche zylindrische Poren, ein unendliches Flüssigkeitsreservoir und kein Einfluss durch Mikrostrukturierung des Papiers sind die entscheidenden Näherungen.^[89]

Üblicherweise werden papierbasierte *Lab-on-Chip Devices* unter Umgebungsbedingungen angewendet. In diesem Fall sollte der Einfluss der *Verdampfung* auf den Fluidtransport nicht vernachlässigt werden, denn die Verdampfung kann den Fluidtransport beeinflussen. Sie ist abhängig von der benetzten Fläche, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und der Wechselwirkung zwischen Fluid- und Papiermolekülen. Folglich sollte sie z.B. beachtet werden, wenn *Lab-on-Chip Devices* unter europäischen Umgebungsbedingungen entwickelt werden, dann aber in Entwicklungsländern angewendet werden sollen. Camplisson *et al.*^[91] entwickelten die Lucas-Washburn-Gleichung unter Beachtung der Verdampfung weiter (Gleichung 8). Hier beziehen sie zusätzlich die Porosität des Papiers P , die Papierdicke s und die Verdampfungsrate der Flüssigkeit q_0 mit ein.^[89]

$$x(t) = \sqrt{\frac{\gamma r P s \cos \theta}{4\mu q_0}} (1 - e^{-2q/Pst}) \quad (8)$$

Der Transport von Analyten in *Lab-on-Chip Devices* ist auch durch *Diffusion* beeinflusst. Sobald ein Papierabschnitt vollständig mit Flüssigkeit gefüllt ist, gewinnt die durch ein Konzentrationsgefälle bedingte Diffusion an Bedeutung. Allerdings ist sie deutlich langsamer als Benetzung und kapillarkraftgetriebener Transport, weshalb sie in Tests mit durchschnittlicher Testlaufzeit vernachlässigt werden kann.

3.2. Adsorption gelöster Stoffe auf festen Oberflächen

Heterogene Katalyse, chromatographische Auftrennung von Stoffgemischen, Färben von Textilien und Papier, Klärung von Abwasser, viele industriell relevante Prozesse beruhen auf der Adsorption gelöster Stoffe auf festen Oberflächen.^[92] Gelangen gelöste Stoffe in Kontakt mit der Oberfläche eines meist porösen Materials (Adsorbens), können sie dort physikalisch (Physisorption) oder chemisch (Chemisorption) gebunden werden. Das dynamische Gleichgewicht zwischen Partikeln/Molekülen in Lösung (Adsorptiv) und gebundenen Partikeln/Molekülen (Adsorbat) kann mit Hilfe von Adsorptionsisothermen beschrieben werden.^[93] Der folgende Abschnitt soll einen thematisch fokussierten Einblick in die für diese Arbeit relevanten Bereiche der Adsorption gelöster Stoffe auf festen Oberflächen liefern. Methodisch wird dabei zunächst auf die chromatographische Auftrennung gelöster Stoffgemische eingegangen. Anschließend soll die Wechselwirkung der für diese Arbeit zentralen Stoffklassen (Farbstoffe und Proteine), mit Oberflächen untersucht werden. Ein besonderer Fokus wird dabei auf die verwendeten Analyte, die Farbstoffe Tartrazin und Methylenblau, sowie das Protein Interleukin 8 gelegt.

3.2.1. Chromatographische Auftrennung gelöster Stoffgemische

"An einer ruhenden (stationären) Phase strömt eine sich bewegende (mobile) Phase vorbei. Die Moleküle der zu trennenden Substanzen können sich dabei in beiden Phasen aufhalten. Der Trenneffekt beruht darauf, dass sich die Verbindungen mit unterschiedlichen, substanzspezifischen Verzögerungen über die chromatographische Trennstrecke bewegen." (Böcker^[94] - S. 32)

Diese allgemeine Definition der Chromatographie ähnelt sehr der Beschreibung von Garnier *et al.*^[6] für die Auftrennung von Stoffgemischen in Papier. Hiernach werden Flüssigkeiten kapillarkraftgetrieben durch Papier transportiert, wobei gelöste Stoffe komponentenspezifische Wechselwirkung mit den Cellulosefasern des Papiers eingehen. So wird eine Auftrennung des Gemischs ermöglicht. Folglich liegt es nahe die Wechselwirkung von gelösten Komponenten mit Cellulosefasern unter chromatographischen Gesichtspunkten genauer zu betrachten. Die beschriebenen "unterschiedlichen, substanzspezifischen Verzögerungen" werden im chromatographischen Begriff der Retention genauer definiert. Die Retention beschreibt ganz allgemein den Prozess der chromatographischen Auftrennung basierend auf den Wechselwirkungen der im Stoffgemisch enthaltenen Komponenten mit der stationären Phase. Zahlreiche Adsorptions- und Desorptionsprozesse führen zu unterschiedlichen Aufenthaltszeiten der zu trennenden Komponenten in/an der stationären Phase, die wiederum zu einer Auftrennung führen. Eine Beschreibung der Retention einer Komponente kann also beispielsweise zur gezielten Auftrennung bestimmter Komponenten genutzt werden.^[94]

Verteilungs- und Adsorptionschromatographie

Grundlegend sind zwei Prinzipien der Chromatographie zu unterscheiden: Verteilung und Adsorption. Allerdings sind sie in der Praxis häufig nicht klar zu trennen.

In der Verteilungschromatographie dient eine in der mobilen Phase unlösliche Flüssigkeit an einem inaktiven Trägermaterial als stationäre Phase. Moleküle verschiedener aufzutrennender Komponenten verweilen abhängig von ihren Verteilungskoeffizienten unterschiedlich lange in/an der stationären Phase. Moleküle mit einer höheren Verweildauer werden folglich langsamer transportiert, als Moleküle mit einer geringeren Verweildauer, was zu einer Auftrennung der verschiedenen Komponenten führt.^[94]

Ein, gerade im Hinblick auf die Wechselwirkung verschiedener Komponenten mit Cellulosefasern, interessantes Beispiel für Verteilungschromatographie ist die *Papierchromatographie*. Als stationäre Phase dient wasserfeuchte Cellulose. Dem gegenüber steht ein nicht mit Wasser mischbares Lösungsmittel als mobile Phase. Wird beispielsweise eine Mischung verschiedener gelöster Aminosäuren aufgetragen, wandern diese horizontal auf der planaren Papierfläche abhängig von ihrem Verteilungskoeffizienten unterschiedlich weit.^[95] Die von den Molekülen einer Komponente A zurückgelegte Strecke a in Relation zu der von der mobilen Phase zurückgelegten Strecke c definiert den Retentionsfaktor (R_f) (Abbildung 25; Gleichung 9).

$$R_f = \frac{\text{Entfernung der Substanz A vom Start}}{\text{Entfernung der Lösungsmittelfront vom Start}} = \frac{a}{c} \quad (9)$$

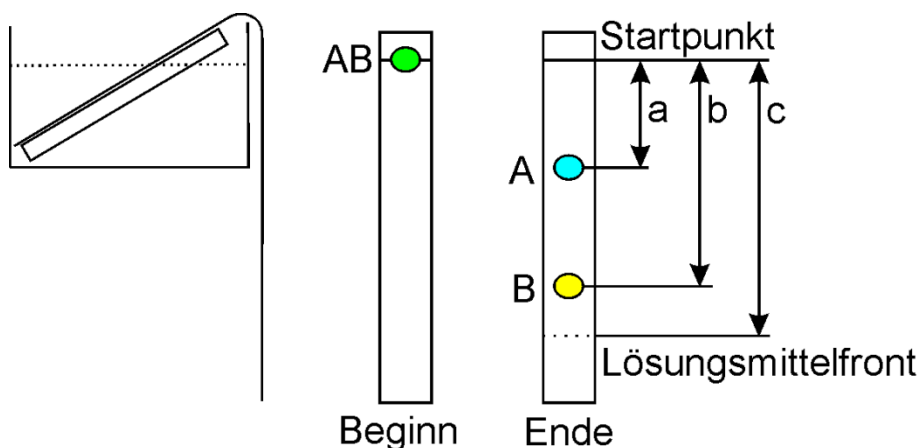


Abbildung 25: Schematische Darstellung eines absteigenden Papierchromatogramms (nach F. Cramer: Papierchromatographie. S.2. 1958. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KHaA. Reproduced with permission^[95]).

Der absolute Vergleich von R_f -Werten ist kritisch, da Temperatur, Konzentration, geringe Inhomogenitäten des Papiers, Faserrichtung des Papiers, Fremdionen und Verunreinigungen des Lösungsmittels einen starken Einfluss auf R_f -Werte haben können. Üblich ist eine bekannte Vergleichssubstanz als Referenz mit zu entwickeln und anschließend in Bezug zu dieser zu argumentieren.^[95]

In der Adsorptionschromatographie sind meist physikalische Wechselwirkungen geringer Adsorptionsenthalpie zwischen den gelösten Komponenten und einer aktiven stationären Phase relevant. Die Komponenten strömen an der stationären Phase vorbei, wobei sie kontinuierlich an der Oberfläche ad- und desorbieren. Es stellt sich ein komponentenspezifisches Gleichgewicht aus gebundenen und gelösten Molekülen ein, dessen Lage maßgeblich für die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle verantwortlich ist. Bei einer hohen Zahl an Adsorptionsplätzen kann bereits ein geringer Unterschied im Adsorptionsverhalten zu einem deutlichen Unterschied in der Gesamtadsorptionszeit zweier Komponenten und so zu einer Auftrennung eines Stoffgemischs führen.^[94, 96]

Ein Spezialfall der Adsorptionschromatographie ist die *Ionenaustauschchromatographie*. In Anbetracht der Tatsache, dass Cellulosefasern in Papier eine pH-abhängige Ladung besitzen (Abschnitt 4.3), hat diese Art der Chromatographie eine besondere Relevanz für den kapillarkraftgetriebenen Stofftransport in Papier. In der Ionenaustauschchromatographie trägt die stationäre Phase geladene, funktionelle Gruppen. Diese können über elektrostatische Wechselwirkungen direkt mit geladenen Komponenten interagieren, während ungeladene Komponenten ungehindert weitertransportiert werden. Gebundene Moleküle können anschließend in Abhängigkeit ihrer Ladungsstärke durch eine kontinuierliche Erhöhung der Salzkonzentration der mobilen Phase nacheinander eluiert und so aufgetrennt werden.^[97] Zu beachten ist, dass auch andere Trennmechanismen wie Ionenpaarbildung und nicht-ionische Wechselwirkungen zum Prozess beitragen können.^[98]

Größenausschlusschromatographie

Garnier *et al.*^[6] definieren neben Adsorption und dessen Spezialfall Ionenaustausch auch Größenausschluss als relevanten Parameter bei der Auftrennung verschiedener Analyten in Papier. In der Größenausschlusschromatographie erfolgt eine Auftrennung der Komponentengemische nach der Größe des hydrodynamischen Radiuses der einzelnen Bestandteile. Die stationäre Phase besteht

aus einem porösen Material mit Porengrößen in der Größenordnung der hydrodynamischen Radien der zu trennenden Moleküle. Kleinere Moleküle können in diese Poren eindringen und müssen so statistisch einen längeren Weg zurücklegen, um die gleiche Position zu erreichen wie größere Moleküle. Größere Moleküle erreichen folglich mit einer deutlich geringeren Verweilzeit das Ende der stationären Phase als kleinere Moleküle, sodass ein Komponentengemisch anhand der Größe der enthaltenen Moleküle aufgetrennt werden kann.^[99]

3.2.2. Von der Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen mit Cellulose(fasern)

Die Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen mit Cellulose(fasern) ist besonders beim Färben von Baumwolltextilien und Papier von Relevanz.^[92] In Abschnitt 3.1.3 ist das Färben von Papier beschrieben. Die diskutierten Mechanismen lassen allgemeine Rückschlüsse auf die Wechselwirkung von Farbstoffen mit Cellulosefasern zu. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe Tartrazin und Methylenblau werden industriell allerdings nicht zum Färben von Papier verwendet. Dennoch sind einige Literaturstellen zur Wechselwirkung der Farbstoff mit cellulosebasierten Materialien bekannt, die im Folgenden neben einer kurzen Vorstellung der verwendeten Farbstoffe zusammengefasst werden.

Tartrazin

Tartrazin (Abbildung 26) ist ein orange-gelber Farbstoff aus der Gruppe der Pyrazolone/Azofarbstoffe mit einem Absorptionsmaximum bei 425 nm.^[100] Das Molekül weist eine Länge von 1,8 nm^[101] auf und enthält mehrere Sulfonsäuregruppen. Würde Tartrazin in der Papierindustrie als Farbstoff verwendet werden, könnte es folglich der Gruppe der sauren nicht-substantiven Farbstoffe zugeordnet werden (Abschnitt 3.1.3). Tartrazin findet Verwendung als weitverbreiteter Lebensmittelfarbstoff (E102). Allerdings ist diese Anwendung umstritten, da Tartrazin im Verdacht steht für Hyperaktivität bei Kindern verantwortlich zu sein und allergische Reaktionen auszulösen.^[102] Tartrazin ist über einen weiten pH-Bereich farbecht und gut wasserlöslich (160 g L⁻¹^[103]). Dies waren wichtige Gründe Tartrazin als Modellfarbstoff in dieser Arbeit zu verwenden.^[100, 102]

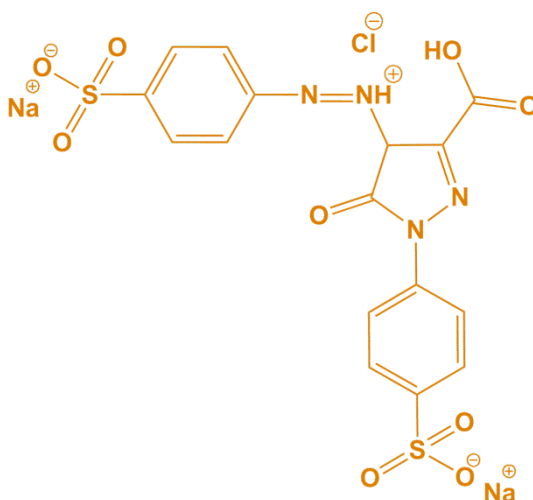


Abbildung 26: Chemische Struktur von Tartrazin im neutralen pH-Bereich.

Wechselwirkung von Tartrazin mit Cellulose

Da Tartrazin ein typischer Lebensmittelfarbstoff ist, und üblicherweise nicht zum Färben von Papier oder Textilien verwendet wird, sind bisher nur wenige wissenschaftliche Arbeiten zur Wechselwirkung von Tartrazin mit celluloseähnlichen Stoffen bekannt. Ziel dieser Publikationen ist üblicherweise die Klärung von farbstoffkontaminiertem Abwasser. Potentiell interessante Aspekte einiger dieser Arbeiten^[101, 104] sind im Folgenden zusammengefasst. Publikationen, die sich detailliert mit der Wechselwirkung von Tartrazin und reiner Cellulose befassen, sind nicht bekannt. Daher wurde ersatzweise die Wechselwirkung von nicht-substantiven, sauren Farbstoffen zur Färbung von Cellulose anhand von Bird *et al.*^[105] betrachtet und ebenfalls kurz zusammengefasst.

In der Publikation von Shiralipour *et al.*^[104b] werden "Celluloseacetat-Nanoschwämme", schwammartig gefälltes Celluloseacetat (Abbildung 27), modifiziert mit Methyltriethylammoniumchlorid zur Konzentration und Entfernung von Tartrazin aus wässriger Lösung verwendet. Der Ladungsnullpunkt dieses Materials wurde auf pH 4 bestimmt. Folglich liegt bei $\text{pH} > 4$ eine negative und bei $\text{pH} < 4$ eine positive Ladung im Bulkmaterial vor. Die stärkste Adsorption von Tartrazin wurde in saurem Medium beobachtet. Daher wird die Adsorption von negativ geladenen Farbstoffmolekülen an im Sauren positiv geladenen Nanoschwämmen auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Ionen und anderer Farbstoffe auf die Tartrazinadsorption untersucht. Dabei wird festgestellt, dass beispielsweise Na^+ bis zu einer Menge von 1000 mg L^{-1} , Br^- bis zu einer Menge von 100 mg L^{-1} und Methylenblau bis zu einer Menge von 50 mg L^{-1} keinen Einfluss auf die Adsorption haben.

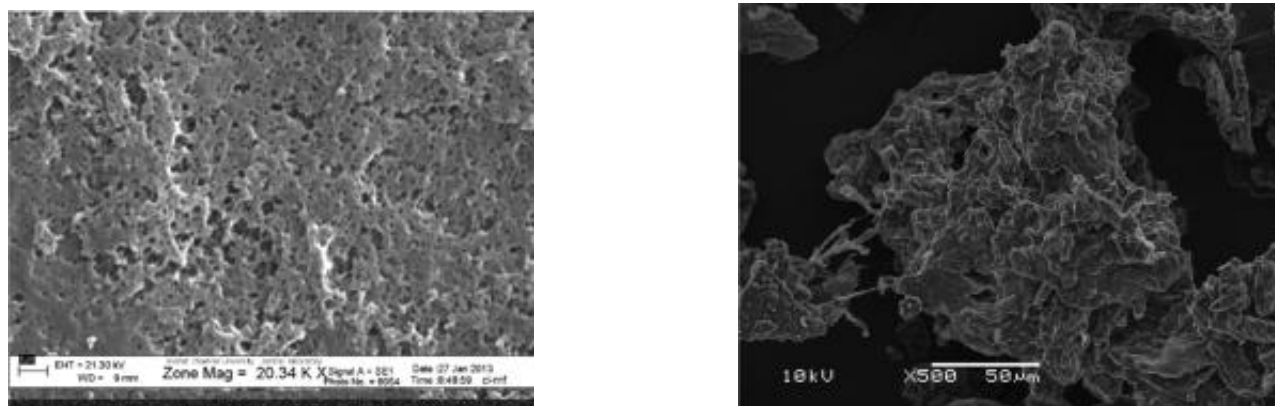


Abbildung 27: Links: SEM-Aufnahme eines modifizierten "Celluloseacetat-Nanoschwamms".^[104b] Rechts: SEM-Aufnahme einer Chitosanprobe.^[101]

Dotto *et al.*^[101] betrachten die Kinetik und den Mechanismus der Tartrazinadsorption an einem Pulver des Polysaccharids Chitosan (mittlerer Porenradius 3,3 nm) (Abbildung 27) bei variierenden pH-Werten. Es wurde eine deutliche Differenz in der Adsorption von Tartrazin an Chitosan bei verschiedenen pH-Werten festgestellt. Die maximale Adsorption wurde im Untersuchungsfenster von pH 3–11 auf pH 3 bestimmt. Dies führen Dotto *et al.* auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den bei diesem pH-Wert negativ geladenen Sulfonatgruppen des Tartrazins und den protonierten Amingruppen des Chitosans zurück. Bei geringerem pH-Wert sind mehr Amingruppen protoniert, was die Anzahl potentieller Adsorptionsplätze erhöht.

Es werden verschiedene Kinetikmodelle getestet und anhand dieser Ergebnissen wird eine Modellvorstellung zum Adsorptionsmechanismus entwickelt. Die Kinetik von Chitosan kann durch

eine *pseudo*-2. Ordnung dargestellt werden, was für einen inneren und äußeren Massetransfermechanismus spricht. In einem Weber-Morris-Plot wurden zwei simultan ablaufende Anteile der Adsorption beobachtet. Außer dem diffusiven Stofftransport durch die Grenzschicht zwischen Feststoff und fluider Phase (Filmdiffusion), war eine sukzessive Adsorption mit intrapartikulärer Diffusion als geschwindigkeitsbestimmender Schritt auszumachen. Eine Erniedrigung des pH-Werts führt in diesem System zu einer leichteren Diffusion der Farbstoffmoleküle in die poröse Struktur der Partikel. Dies liegt in durch Quellung geweiteten Poren begründet. Größere Poren erleichtern den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der intrapartikulären Diffusion und damit die Adsorption.

Banerjee *et al.*^[104a] untersuchen die Wechselwirkung von Tartrazin mit Sägemehl u.a. in Abhängigkeit des pH-Werts. Sie beschreiben als Hauptkomponenten des Sägemehls Cellulose und Lignin sowie Komponenten mit vielen phenolischen Hydroxylgruppen wie Tannin. Der Ladungsnullpunkt des Sägemehls wird auf pH 6 bestimmt. Folglich ist das Sägemehl für pH>6 negativ und für pH<6 positiv geladen. Dies hat einen entscheidenden Einfluss auf die Aufnahme von Tartrazin. Wie Banerjee *et al.* beschreiben, ist aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der Sägemehloberfläche und dem negativ geladenen Farbstoff die Wechselwirkung im Untersuchungsfenster von pH 2–12 bei pH 3 maximal. Mit Zunahme des pH-Wertes reduzieren sich die positiv geladenen Gruppen und die Tartrazinadsorption nimmt ab. Darüber hinaus beschreiben sie bei sehr hohen pH-Werten eine Konkurrenz in der Adsorption zwischen Hydroxidionen und negativ geladenen Farbstoffmolekülen.

Neben dem Einfluss des pH-Werts untersuchen Banerjee *et al.* auch den Einfluss der Kontaktzeit. Es kann festgestellt werden, dass nach Einstellung eines Gleichgewichts nach 70 min kein weiterer Farbstoff mehr aufgenommen wird. Dies wird darauf zurückgeführt, dass nach einer bestimmten Zeit alle Adsorptionsplätze besetzt sind und eine abstoßende Wechselwirkung zwischen Adsorbat und Adsorptiv entsteht. Auch von Banerjee *et al.* wurde festgestellt, dass die Tartrazinadsorption in diesem Fall an Sägemehl von Film- und intrapartikulärer Diffusion bestimmt wird.

Auch thermodynamische Betrachtungen werden angestellt. Bei der Evaluation mehrerer Adsorptionsisothermen wird eine Übereinstimmung mit dem Modell der Dubini-Radushkevich-Isotherme gefunden. Dieses Modell beschreibt wie eine Langmuir-Isotherme eine Monolage, ist aber für Adsorption an heterogenen und homogenen Oberflächen geeignet. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der Adsorption von Tartrazin an Sägemehl aufgrund der bestimmten Adsorptionsenergie $< 4 \text{ kJ mol}^{-1}$ um Physisorption handeln muss. Die Adsorption des Farbstoffs ist endotherm. Sie läuft dennoch freiwillig ab, da sie mit einer deutlichen Zunahme der Entropie, bedingt durch eine größere Unordnung der Farbstoffmoleküle nahe der Oberfläche, verbunden ist.

Bei der Analyse 15 verschiedener, saurer Farbstoffe aus Wasser an Cellulosefasern stellten Bird *et al.*^[105] fest, dass die Adsorption meist Enthalpie und nur selten Entropie getrieben ist. In Bezug auf die erwarteten Bindungsarten der Adsorption fokussierten sich Bird *et al.* auf die Evaluation von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Bindungen. Wasserstoffbrückenbindungen als zentraler Aspekt werden als weniger wahrscheinlich angesehen. Einerseits korrelieren Struktur- und Enthalpieänderungen nicht mit dieser Hypothese. Andererseits wird erwartet, dass die für Wasserstoffbrückenbindungen benötigten Hydroxylgruppen der Cellulose hauptsächlich unzugänglich, da in der internen Cellulosestruktur gebunden, vorliegen. Stattdessen postulieren Bird *et al.*^[105] eine vorwiegend Van-der-Waals getriebene Adsorption. Dies begründen sie mit der

Beobachtung, dass eine gute Adsorption mit einer simulierten räumlichen Nähe des hydrophoben Farbstoffzentrums zur Cellulosefaser korreliert. Bei Farbstoffen, in denen aufgrund räumlich ungünstig verteilter Sulfonsäuregruppen ein größerer Abstand zur Cellulosefaser simuliert wurde, war auch die gemessene Adsorption geringer.

Methylenblau

Methylenblau (Abbildung 28) ist ein blauer Farbstoff aus der Gruppe der Phenothiazine mit einem Absorptionsmaximum bei 661 nm.^[100] Das Molekül weist eine Größe von 1,0 x 0,5 nm^[106] auf. Methylenblau ist wasserlöslich (40 g L⁻¹^[107]) und im sauren und neutralen pH-Bereich farbecht. Der Farbstoff wurde ursprünglich als Färbemittel für Textilien und Leder eingesetzt und kann der Gruppe der basischen nicht-substantiven Farbstoffe zugeordnet werden.^[108] Bereits früh wurde auch sein Potential in der Anwendung zur Färbung in der Mikroskopie^[108-109] und in der Medizin z.B. als Therapeutikum für Malaria^[110] erkannt. Darüber hinaus findet Methylenblau Anwendung als Redoxindikator.^[111]

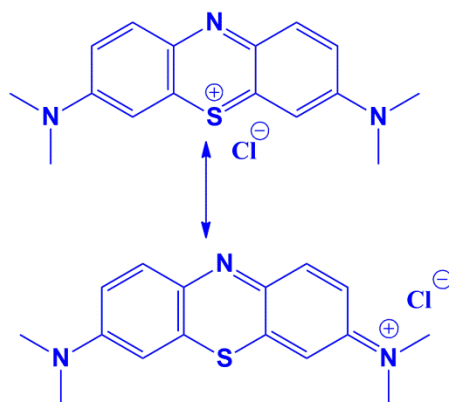


Abbildung 28: Chemische Struktur von Methylenblau im neutralen pH-Bereich.

Wechselwirkung von Methylenblau mit Cellulose

Publikationen zur Adsorption von Methylenblau an (nanokristalliner) Cellulose befassen sich hauptsächlich mit dem Thema der Aufreinigung von farbstoffkontaminierten Industrieabwässern. Die für diese Arbeit wichtigsten Aspekte aus drei repräsentativen Publikation, sind im Folgenden wiedergegeben.

Batmaz *et al.*^[112] untersuchten die Adsorption von Methylenblau an nanokristalliner Cellulose in Abhängigkeit von u.a. pH-Wert und Ionenkonzentration. Danach konnte im untersuchten pH-Wert Bereich von pH 2,5 bis 10 kein Einfluss des pH-Werts auf die Adsorption festgestellt werden. Der Einfluss der Ionenkonzentration wurde anhand von Natriumchloridlösungen im Konzentrationsbereich von 600 mg L⁻¹ bis 1600 mg L⁻¹ analysiert. Batmaz *et al.* fanden heraus, dass hierbei die Aufnahme des Farbstoffes leicht zurückgeht, was auf eine erhöhte Zahl an positiv geladenen Natriumionen zurückgeführt werden kann, die mit den positiv geladenen Methylenblaumolekülen um die Adsorptionsplätze konkurrieren. Die Adsorption konnte gut mittels einer Langmuirisotherme beschrieben werden. Thermodynamisch betrachtet ist die Adsorption von Methylenblau ein spontaner Prozess, der schwach exotherm sowie entropisch begünstigt ist und damit vermutlich physikalischer Natur ist.

Kaewprasit *et al.*^[113] beschreiben wassergequollene Cellulose als gutes Material für die Wechselwirkung mit Methylenblaumolekülen. Diese können die Wassermoleküle an der Celluloseoberfläche einfach austauschen. Sie bestimmen für die Adsorption von Methylenblau an Cellulosefasern nanokristalliner Cellulose eine Langmuirisotherme (vgl. Batzman *et al.*^[112]). Anhand der Form der Isotherme schließen sie auf eine Van-der-Waals-Wechselwirkung der Methylenblaumoleküle mit der Celluloseoberfläche. Eine Langmuirisotherme definiert eine Monolagenadsorption mit einem Sättigungspunkt oberhalb dessen keine weiteren Moleküle mehr adsorbiert werden können. Folglich erhöht eine größere Methylenblaukonzentration in Lösung ab einem bestimmten Punkt, die Menge an adsorbiertem Methylenblau nicht weiter. Konkret postulieren Kaewprasit *et al.*^[113] Wechselwirkungen zwischen den Hydroxylgruppen der Cellulosefasern und den Aminen sowie dem Schwefelatom im Phenothiazingerüst des Methylenblaumoleküls bei der Adsorption.

Palit *et al.*^[92] untersuchten die Adsorption des reinen kationischen Farbstoffs Methylenblau sowie der Mischung mit anionischem Methylorange auf negativ geladener Cellulosefaseroberfläche. Aus der Messung von Adsorptionsisothermen bei verschiedenen Temperaturen geht eine starke, exotherme Adsorption elektrostatischer Natur der positiv geladenen Methylenblaumoleküle mit den negativ geladenen Cellulosefasern hervor. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich die Adsorption durch die Anwesenheit von Salz (KCl) verlangsamt. Dies führten Palit *et al.* auf eine verringerte Anziehung zwischen dem kationischen Farbstoffmolekülen und der negativ geladenen Celluloseoberfläche zurück. Neben der Adsorption des reinen Methylenblaus wurde zusätzlich die Adsorption einer Methylenblau-Methylorange-Mischung untersucht. In Anwesenheit von Methylorange nimmt die Adsorption von Methylenblau aus Lösung leicht ab. Da dieser Effekt durch Messungen bei erhöhter Temperatur verstärkt wird, kann vermutet werden, dass in einer Mischung beider Farbstoffe ein Komplex gebildet wird.

3.2.3. Adsorption von Proteinen an Oberflächen

Proteinadsorption ist der erste Schritt der biologischen Antwort eines Organismus auf künstliche Materialien. In biomedizinischen Diagnostiktests müssen Analytproteine in bestimmten Bereichen der Teststreifen selektiv binden, während in den übrigen Bereichen Proteine möglichst nicht adhären sollen. Die biotechnologische Aufreinigung von Proteinen basiert häufig auf deren Wechselwirkung mit Oberflächen und ist folglich die Grundlage für die Anwendung diverser Methoden wie z.B. Chromatographie. Kurz gesagt: Proteinadsorption an Oberflächen spielt eine zentrale Rolle bei einer Reihe von biologischen, medizinischen oder auch biotechnologischen Prozessen.^[60, 114]

Dennoch ist trotz intensiver Forschung das Phänomen der Proteinadsorption an Oberflächen noch immer nicht ausreichend verstanden. Oberflächen mit gezielten Antifouling-Eigenschaften und höchst effizienten spezifischen Bindungsbereichen konnten bisher nicht immer zuverlässig realisiert werden.^[60, 114a] Auch eine Vielzahl an Literatur kann bei genauerer Betrachtung nur bedingt allgemein gültige Trends über die Adsorption von Proteinen definieren, denn meist können beobachtete Trends durch mindestens ein Gegenbeispiel entkräftet werden.^[114b]

Da die Wechselwirkung von IL-8-TAMRA mit Papier nicht Literatur bekannt ist, werden im Folgenden Literatur bekannte Konzepte zur Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen teilweise spezifisch mit Papier diskutiert. Anschließend wird das verwendete Protein IL-8 genauer beschrieben. Das so vermittelte Hintergrundwissen soll eine Beurteilung der IL-8-Retention in Papier in Kapitel 7 ermöglichen.

Prinzipien der Proteinadsorption

Ob ein Protein adsorbiert oder nicht, ist nach Vogler *et al.*^[114b] von der freien Enthalpie der Adsorption abhängig. Ist die freie Enthalpie negativ, findet eine spontane Adsorption statt, während bei einer positiven Bilanz keine freiwillige Adsorption erfolgt. Einfluss auf die Proteinadsorption können folglich entropische und enthalpische Parameter haben.^[60] Norde *et al.*^[115] und Rabe *et al.*^[114a] fokussieren die Proteinadsorption dabei auf drei zentrale Aspekte: Der hydrophobe Effekt, elektrostatische Wechselwirkungen und die adsorptionsbedingte Konformationsänderung des Proteinmoleküls. Alle drei Aspekte kommen meist gleichzeitig aber unterschiedlich stark zum Tragen und beeinflussen einander.

Der hydrophobe Effekt kommt zustande, da Wassermoleküle danach streben Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Folglich orientieren sich Wassermoleküle benachbart zu (überwiegend) unpolaren Molekülen oder Oberflächen meist stark, um eine maximale Zahl an Wasserstoffbrücken zu den Wassermolekülen in der Umgebung zu generieren. Dies bedingt eine reduzierte Entropie. Eine Wechselwirkung von hydrophoben Proteinen oder Proteinteilen mit einer hydrophoben Oberfläche aus wässriger Lösung ist folglich entropisch begünstigt, da stark orientierte, meist nur schwach gebunden Wassermoleküle an der Oberfläche von Protein und Substrat frei beweglich werden. Bei einem geringeren Enthalpieverlust durch die Ablösung der Wassermoleküle von der Oberfläche erhöht sich ihre Entropie deutlich, sodass die freie Enthalpie insgesamt absinkt. Eine Wechselwirkung von hydrophilen Proteinen oder Proteinteilen mit hydrophilen Oberflächen ist dagegen eher unwahrscheinlich, da die Hydrierung beider Oberflächen gegenüber der Wechselwirkung miteinander bevorzugt ist. So können Oberfläche und Protein(teile) Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen ausbilden, was die Gesamtzahl der Wasserstoffbrücken und damit die Enthalpie erhöht. Diese beschriebene Änderung des Hydrationszustands des Proteins und der Oberfläche wird als hydrophober Effekt bezeichnet. Er ist ein zentraler Punkt für die Beurteilung der Adsorption von Proteinen an Oberflächen.^[60, 114b, 115]

Ebenfalls entscheidend bei der Proteinadsorption und oft im Gegensatz zum hydrophoben Effekt steht die Adsorption durch elektrostatische Wechselwirkungen. Treten geladene Proteine und Oberflächen miteinander in Kontakt, überlappen die elektrostatischen Doppelschichten. Im Falle gegensätzlicher Ladungen führt dies zu einer reduzierten freien Enthalpie und ist daher bevorzugt. Das Protein wird adsorbiert. Dies tritt allerdings nur unter der Voraussetzung ein, dass die Menge der beiden gegensätzlichen Ladungen ungefähr gleich ist. Sollte eine Ladung deutlich erhöht sein, ist im Adsorptionszustand kein Ladungsausgleich mehr möglich, was einer Adsorption entgegen spricht. Bei gleichnamiger Ladung von Protein und Oberfläche ist eine Adsorption aufgrund der elektrostatischen Abstoßung eher unwahrscheinlich, aber dennoch nicht unmöglich. Ordnen sich kleine Ionen aus der Lösung zwischen den gleichnamig geladenen Proteinen und der Oberfläche an, ist ein Ladungsausgleich gegeben. Eine Adsorption könnte erfolgen.^[115] Beachtet werden muss darüber hinaus auch die Tatsache, dass sich gleichnamig geladene Proteine untereinander abstoßen können. So kann sich trotz negativer Enthalpie der Adsorption der Bedeckungsgrad einer Oberfläche reduzieren.

Schließlich ist die Proteinadsorption auch abhängig von der Konformationsänderung der Proteine bei der Adsorption an einer Oberfläche. Üblicherweise tritt ein Protein erstmals in seiner nativen Form mit einer Oberfläche in Kontakt. Abhängig von der Art des Proteins, der Oberfläche und externen Parametern kommt es dadurch zu einer strukturellen Umorganisation. Diese kann sowohl die Adsorptionseenthalpie durch neue Wechselwirkungen bestimmter Proteinteile mit der Oberfläche verringern, als auch die Adsorptionseentropie durch Entfaltung von Strukturelementen erhöhen. Folglich wird häufig beobachtet, dass die Bindungsstärke von Proteinen mit der Zeit zunimmt. Ein

Verlust der Struktur kann wiederum zum Verlust der Proteinfunktion führen. Besonders weniger stabile Proteine in einem Milieu mit einem pH-Wert weit entfernt vom isoelektrischen Punkt (IEP) an hydrophoben Oberflächen sind von Konformationsänderungen bei der Adsorption betroffen.^[114a, 115]

Einfluss externer Parameter

Externe Parameter, wie pH-Wert, Ionenstärke, Pufferart oder Temperatur können einen Einfluss auf die beschriebenen Wechselwirkungen der Proteine mit der Oberfläche haben.

In Bezug auf externe Parameter kann zunächst festgestellt werden, dass der pH-Wert einer Lösung den Ladungszustand des Proteins und häufig auch der Oberfläche bestimmt. Somit gestaltet er maßgeblich die Möglichkeiten für elektrostatische Wechselwirkungen und besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Adsorption der Proteine.^[114a] Auch die Ionenstärke einer Lösung beeinflusst die elektrostatisch bedingte Proteinadsorption. Je höher die Ionenstärke, desto kürzer reichen elektrostatische Wechselwirkungen. Folglich ist die Adsorption von gegenteilig geladenen Protein-Substrat-Systemen verringert. Bei gleichnamiger Ladung verstärkt sich die Adsorption hingegen.^[114a] Auch die Art der in der Lösung enthaltenen Salzionen kann bedingt durch eine unterschiedlich starke chaotrope Wirkung einen Einfluss auf den hydrophoben Effekt und damit auf die Aggregation bzw. Denaturierung der Proteine haben. Hierdurch kann die Adsorption entscheidend beeinflusst werden. Eindeutige Aussagen zu allgemeinen Trends z.B. anhand der Hofmeisterreihe lassen sich allerdings nach bisherigen Erkenntnissen nur bedingt treffen.^[114a, 114c]

Die Freisetzung adsorbierter Wassermoleküle sowie Konformationsänderungen sind zentrale Aspekte der Proteinadsorption, die durch eine Erhöhung der Entropie getrieben sind. Folglich verstärkt eine Temperaturerhöhung die durch diese Aspekte bedingte Adsorption von Proteinen.^[114a, 114c]

Einfluss der Oberflächeneigenschaften

Die Eigenschaften einer Oberfläche haben einen deutlichen Einfluss auf deren Wechselwirkung mit Proteinen. Besonders entscheidend sind dabei die Oberflächenenergie, die Polarität, die Ladung und die Morphologie der Oberfläche.^[114a] Nach Rabe *et al.*^[114a] adhären Proteine stärker an unpolaren als an polaren Oberflächen; an Oberflächen mit hoher Oberflächenspannung als an Oberflächen mit geringer Oberflächenspannung und an geladenen als an ungeladenen Oberflächen. Dies steht in Einklang mit den beschriebenen Prinzipien der Proteinadsorption. Gong *et al.*^[60] beschreiben, dass die Proteinadsorption vor allem an stark hydrierten Oberflächen verringert ist, während hydrophobe Oberflächen aufgrund ihres geringen Potentials zur Wechselwirkung mit Wassermolekülen enthalpisch und entropisch häufig eine Proteinadsorption bevorteilen.^[60] Diese Erklärungen können allerdings nur als Ansätze angesehen werden, da Oberflächen mehrere, teilweise auch kontroverse Eigenschaften aufweisen können. Nach Rabe *et al.*^[114a] ist beispielsweise eine geladene Oberfläche polar und reterniert Proteine schwächer, kann aber ladungsbedingt trotzdem starke Proteinadsorption aufweisen. Folglich muss jede Oberfläche einzeln betrachtet werden. Dies wird beispielsweise bei der Betrachtung der Wechselwirkung von Proteinen mit verschiedenen Polymeroberflächen deutlich.^[116] Während Polyethylenglykol (PEG) und Polydimethylacrylamid (PDMAA) proteinabweisend wirken, reterniert Polyacrylsäure (PAA) Proteine unter bestimmten Bedingungen sogar im nativen Zustand.^[114a, 117]

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Papier ist nur in sehr wenigen Studien untersucht.^[116] Cellulose ist hydrophil und leicht anionisch (vgl. Abschnitt 3.1). Folglich kann die Adsorption von Proteinen an Cellulosefasern durch Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische

Wechselwirkungen und/oder hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen. Hauptsächlich scheint eine Adsorption durch kationische Patches und Tyrosingruppen in der Proteinstruktur begründet zu sein. Die Stärke der Proteinbindungen und ihre Adsorptionsdichte scheint von pH-Wert und der ionischen Stärke der Lösung beeinflusst zu sein.^[12]

Einfluss der Proteineigenschaften

Relevante Parameter zur Beurteilung der Adsorption von Proteinen an Oberflächen in Bezug auf die Proteineigenschaften sind besonders Ladung, Größe und Strukturstabilität, aber auch Aminosäurezusammensetzung und Konformation des betrachteten Proteins.^[114a, 114c, 115] Diese Eigenschaften ermöglichen eine Einteilung der Proteine in zwei Gruppen, die ein unterschiedliches Verhalten bei der Wechselwirkung mit Oberflächen aufweisen. Kleine, unelastische, konformell stabile Proteine werden als "harte" Proteine bezeichnet und zeigen üblicherweise eine geringe Tendenz zur Strukturänderung bei Oberflächenadsorption.^[114c] Folglich ist eine Adsorption "harter" Proteine an hydrophile Oberflächen meist gering, denn sie wäre vor allem durch Konformationsänderungen und weniger durch den hydrophoben Effekt begünstigt. Eine Ausnahme bilden harte Proteine, deren Adsorption durch elektrostatische Anziehung unterstützt wird.^[114c] An hydrophoben Oberflächen kann unabhängig von der Stabilität der Proteine eine Strukturänderung stattfinden, sodass auch "harte" Proteine an hydrophoben Oberflächen adsorbieren können.^[115] Große Proteine mit geringer intrinsischer Stabilität werden als "weiche" Proteine bezeichnet. Sie adsorbieren an allen Oberflächen unabhängig von deren Beschaffenheit oder Ladung sehr gut, da der Entropiegewinn durch die starke Konformationsänderung bei der Adsorption überwiegt.^[114c] Die Proteineigenschaften sind u.a. auch für die Ausbildung der Schicht der adsorbierten Proteine an der Oberfläche verantwortlich. Während geladene Proteine bedingt durch die intrinsische Abstoßung meist nur in einer Monolage adsorbieren, bilden "weiche" Proteine oft Multilagen aus.^[114a] Folglich beeinflusst die Proteinart neben der Oberflächenbeschaffenheit und dem vorherrschenden Adsorptionsprinzip auch die Menge an adsorbiertem Protein. Meist entspricht sie einigen Milligramm pro m².^[114c]

3.2.4. Interleukin-8 (IL-8)

Aufgrund einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Schmitz der TU Darmstadt, wird in dieser Arbeit das zur Familie der Chemokine gehörende Protein Interleukin-8 (IL-8) verwendet. Chemokine regulieren maßgeblich die Migration von Immunzellen als zentralen Punkt der Arbeit des humanen Immunsystems.^[118] Folglich spielen sie bei einer Vielzahl von Krankheiten eine wichtige Rolle und sind daher von besonderem Interesse für die Forschung.^[119]

Chemokine (chemotaktische Cytokine) sind kleine (70–130 Aminosäuren) sekretorische Signalproteine, die von Leukozyten und verschiedenen Gewebs- und Blutzellen sekretiert werden.^[120] Abhängig von ihren Aufgaben können sie in zwei Unterfamilien gegliedert werden: homöostatische Cytokine und inflammatorische Cytokine. Homöostatische Cytokine werden konstitutiv exprimiert und dirigieren hauptsächlich Leukozyten bei der Blutbildung und Überwachung gesunden Gewebes. Inflammatorische Cytokine sollen ausschließlich nach Aktivierung Leukozyten bei Infektionen, Entzündungen, Verletzungen oder Tumoren "anlocken".^[118a]

IL-8 gehört zu der Gruppe der inflammatorischen Cytokine.^[118a] Dessen Hauptaufgaben sind die selektive Anziehung von neutrophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und T-Zellen sowie die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten.^[121] Das gegen Peptidasen, Hitze, extreme pH-Werte

und viele denaturierende Agenzien sehr stabile Protein weist wie die meisten Chemokine einen basischen isoelektrischen Punkt (8,3^[122] bzw. 9,4^[123]) auf. Folglich besitzt es bei physiologischem pH-Wert eine positive Nettoladungen, die zu einer ladungsbedingten Wechselwirkung mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen auf Zelloberflächen führt.^[124]

Allen Chemokinen gemein ist eine ähnliche Tertiärstruktur, die als zentrale Strukturelemente ein antiparalleles β -Faltblatt, eine α -Helix sowie zwei Disulfidbrücken aufweist.^[120] Die überwiegend vorliegende Variante des IL-8 besteht aus 72 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 8.383 Da.^[122, 125] Baldwin *et al.*^[126] publizierten die Tertiärstruktur des zur Dimerisierung neigenden Proteins in Lösung wie in Abbildung 29 dargestellt.

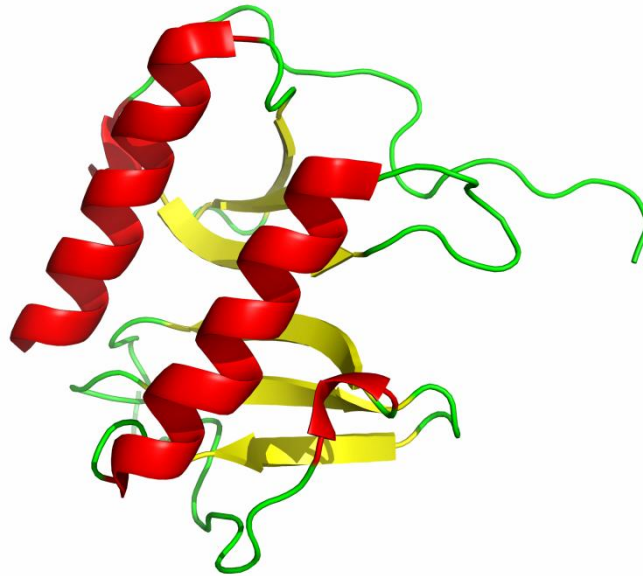


Abbildung 29: Tertiärstruktur des IL-8 Dimers basierend auf der NMR-Struktur (PDB: 1IL8)^[121] Die verschiedenen sekundären Strukturelemente sind farblich markiert (β -Faltblatt in Gelb, α -Helix in Rot, Schleifen in Grün). Darstellung mit *Edu PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.

Stand der Literatur: Adsorption von IL-8 an Oberflächen

IL-8 ist ein kleines (8 kDa) und relativ stabiles Protein mit klar definierten Strukturelementen und Disulfidbrücken. Daher lässt es sich als hartes Protein einordnen (vgl. Abschnitt 3.2.3). Folglich ist eine Wechselwirkung mit hydrophilen Papierfasern eher unwahrscheinlich, außer elektrostatische Wechselwirkungen spielen eine Rolle.

Die Adsorption von IL-8 an verschiedenen Oberflächen wird in der Literatur hauptsächlich mit dem Ziel der Filtration von Blut zur Behandlung einer Sepsis untersucht.^[123, 127] Jüngere Literatur untersucht die Wechselwirkung mit Nanopartikeln.^[128] Auch an der TU Darmstadt im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Schmitz wird IL-8 intensiv beforscht.^[119, 129]

Hei *et al.*^[123] beobachten eine moderate bis starke Adsorption von IL-8 an verschiedenen Silicaoberflächen, die durch Zugabe von menschlichem Serumalbumin im Puffer noch gesteigert wurde. Dem entgegen stehen die Untersuchungsergebnisse von Lee *et al.*^[128], die herausfanden, dass IL-8 eine geringe Adsorptionsaffinität auf Siliziumnanopartikeln habe, die durch fötales Rinderserum in der Lösung noch reduziert wird. Bouman *et al.*^[127a] untersuchten die Filtrationswirkung verschiedener Polymermembranen für IL-8 und stellten fest, dass Polysulfon, Polyamid und Celluloseacetat nur geringe Mengen filtern, während Polyacrylonitril gute Filtereigenschaften aufweist, die hauptsächlich auf die Proteinadsorption zurückgeführt wurden.

Untersuchungen im Arbeitskreis Schmitz an der TU Darmstadt legen darüber hinaus nahe, dass trotz erwarteter elektrostatischer Wechselwirkung des positiv geladenen IL-8 (unterhalb IEP) nicht an eine negativ geladene Polystyroloberfläche bindet.^[118b] Allerdings wurde eine unspezifische Wechselwirkung von IL-8 mit BSA beobachtet.^[129]

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich anhand der beschriebenen zahlreichen Einzelstudien leider kein allgemein gültiger und folglich auf Paperoberflächen übertragbarer Trend definieren lässt und bis heute noch fundamentale Wissenslücken bestehen. Folglich wird die Retention von IL-8 in Papier in Kapitel 7 eingehend untersucht.

3.3. Methodenentwicklung: Durchführung und Auswertung von Retentionsexperimenten

Die im Folgenden beschriebene Methode zur Analyse der Retention wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Anhand dieser Methode wurden die Ergebnisse in Kapitel 5, 6 und 7 ermittelt. Neben einer Beschreibung der Methode liefert der folgende Abschnitt eine Erklärung, wie und warum die Parameter, wie beschrieben, definiert sind. Hauptsächlich wurde das für wasserbasierte Lösungen geeignete, horizontale System (Abschnitt 3.3.1) verwendet. Zur Untersuchung lösungsmittelhaltiger Fluide wurde darüber hinaus ein vertikales System (Abschnitt 3.3.2) entwickelt.

3.3.1. Horizontales System

Strukturierung des Substrats

Zur Mikrostrukturierung der Papiersubstrate wird die von Böhm *et al.*^[23] (Abschnitt 1.1) publizierte Methode der Lithographie mit photoreaktiven Polymeren verwendet. Diese Methode wurde gewählt, da es sich hierbei um die einzige Methode handelt, die eine mehrstufigen Strukturierung verschiedener Funktionalitäten in das Papiersubstrat ermöglicht. Zwar wäre für die in Kapitel 5 und 7 durchgeführten Retentionsexperimente auch eine Mikrostrukturierung mittels Wachs- oder AKD-Druck ausreichend, allerdings soll aus Gründen der Vergleichbarkeit soweit wie möglich für alle Versuche die gleiche Strukturierungsmethode eingesetzt werden. Die Details der Herstellung der Kanalstrukturen sind in Abschnitt 9.5 beschrieben.

Als Struktur wurde ein gerader Kanal mit einer Länge von 5 cm und einer Breite von 0,4 cm, der zu einer Seite hin geöffnet ist, gewählt. Die gerade Geometrie scheint für Retentionsexperimente besonders geeignet, da zurückgelegte Strecken gut abgemessen werden können. Eine Länge von 5 cm erwies sich in Vorversuchen als sinnvoll, da die von der Analytlösung zurückgelegte Strecke ausreichend Möglichkeit zur Beobachtung des Retentionsverhaltens bietet. Eine Breite von 4 mm liegt deutlich oberhalb der maximalen Länge verwendeter Cellulosefasern (< 2 mm; vgl. Abschnitt 4.2). Somit kann ein Einfluss querliegender Cellulosefasern auf die Flussrate des Fluids in den Kanälen ausgeschlossen werden (vgl. Böhm *et al.*^[26]). Die Öffnung des Kanals zu einer Seite hin ermöglicht eine einfache Kontaktierung des Kanals zu einem "unendlichen" Fluidreservoir. Dies gewährleistet hinter der Kontaktstelle einen vollständig kapillarkraftgetriebenen Fluidtransport.

Versuchsaufbau

Das mikrostrukturierte Substrat wird in den hydrophoben Bereichen mit Foldbackclips auf einem Kunststoffobjektträger befestigt. Diese flexible Fixierung ermöglicht einen schnellen Probenwechsel, was die Anwendung auch im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als μ PAD vereinfacht. Um eine einfache Kontaktierung zum Fluidreservoir zu gewährleisten, ragt das Papiersubstrat knapp einen

Zentimeter über den Kunststoffobjektträger hinaus. So kann es mit dem Fluidreservoir, einem randvollen Uhrglas, kontaktiert werden (Abbildung 30).

Da nach Schilling *et al.*^[130] die Luftfeuchtigkeit und nach Walji *et al.*^[131] die Temperatur des Fluids einen Einfluss auf die zeitabhängige Laufweite einer Flüssigkeitsfront haben kann, werden alle Retentionsexperimente unter Normklimabedingungen (23 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit) durchgeführt. Die Auftragung der Analytlösung (Farbstoff- oder Proteinlösung) erfolgt mittels einer Eppendorfpipette. Dies ermöglicht die Auftragung eines sehr definierten Volumens von 0,5 µL einer beliebigen Lösung an einer flexibel zu definierenden Position.

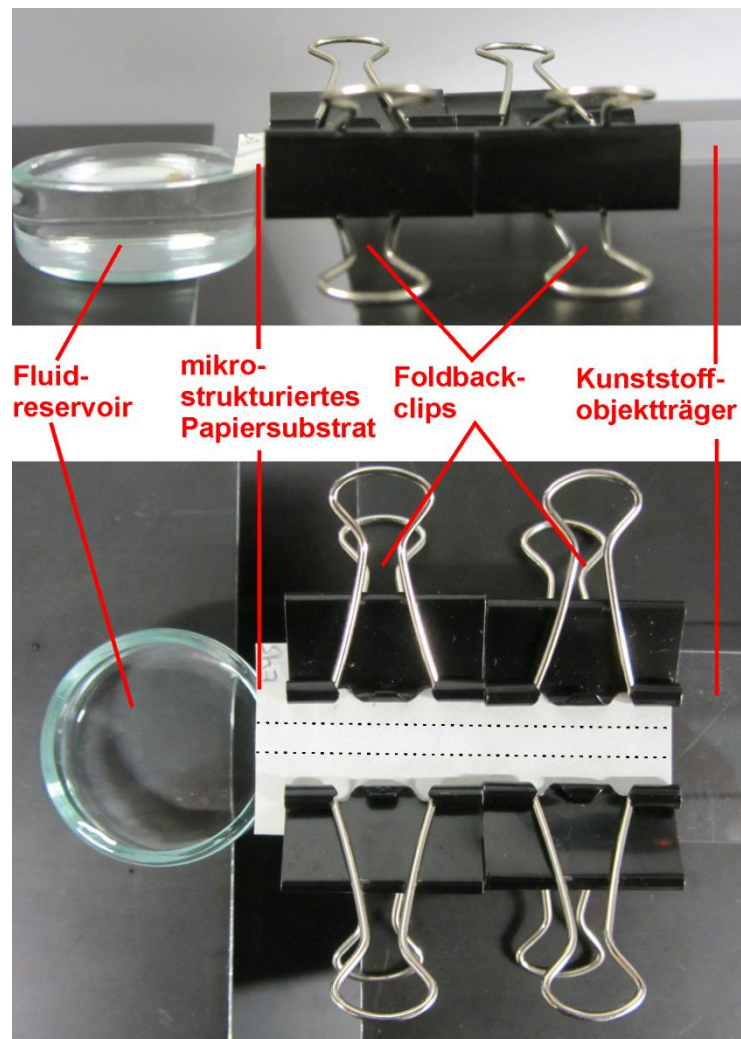


Abbildung 30: Fotografien des Versuchsaufbaus für Retentionsexperimente im horizontalen System (oben: Seitenansicht; unten: Aufsicht). Das mikrostrukturierte Papiersubstrat (Kanalstruktur durch gestrichelte Linie verdeutlicht) ist mit Foldbackclips auf einem Kunststoffobjektträger so fixiert, dass der Kanal auf der Seite des Fluidreservoirs (randvolles Uhrglas) herausragt und das Fluid kontaktieren kann. Der Aufbau erfolgt unter Normklimabedingungen (23 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit).

Durchführung

Als Beginn des Experiments wird die Kontaktierung des Papiersubstrats mit dem Fluidreservoir definiert. Sobald die Fluidfront innerhalb des Kanals 1,5 cm zurückgelegt hat, werden 0,5 µL der Analytlösung 0,5 cm hinter der Fluidfront aufgetragen. Diese Abmessungen werden gewählt, da nach einer Laufweite von ca. einem Zentimeter angenommen werden kann, dass der Transport des Fluids im Kanal ausschließlich kapillarkraftgetrieben stattfindet. Durch die Auftragung der

Analytlösung hinter der Fluidfront kann die Betrachtung des Systems vereinfacht werden. So können mögliche Wechselwirkungen der Analytmoleküle mit trockenen Fasern vernachlässigt werden. Eine separate Auftragung des Analyten als Spot erfolgt einerseits, um neben der Laufweite des Analyten auch die Verbreiterung des Spots betrachten zu können und andererseits, da so im Hinblick auf eine spätere Anwendung ein deutlich geringeres Probenvolumen eingesetzt werden kann.

Das Ende einer Messung variiert abhängig von der Art der aufgetragenen Analytlösung. Bei Farbstofflösungen ist die Messung beendet, sobald die Fluidfront das Ende des Kanals erreicht. Die Zeit, die die Fluidfront benötigt, den gesamten Kanal zu passieren (Laufzeit t), wird in Anlehnung an das Standardverfahren zur Bestimmung der Fließgeschwindigkeit in Nitrocellulosemembranen^[8] mit einer Stoppuhr gemessen. Bei Proteinlösungen wird die Messung hingegen nach exakt 12 min abgebrochen, indem der Kanal vom Fluidreservoir getrennt wird. Die Position der Fluidfront zu diesem Zeitpunkt wird markiert. Das unterschiedliche Vorgehen liegt im jeweils vorwiegend genutzten Papiersubstrat begründet. Die Farbstoffretention wird hauptsächlich in Papieren aus Eukalyptussulfatzellstoff betrachtet, während die Proteinretention ausschließlich in Baumwollinterspapieren untersucht wird. Da Baumwollinterspapiere eine deutlich geringere Flussrate aufweisen als Eukalyptussulfatpapiere (vgl. Böhm *et al.*^[26]) wird aus Zeiteffizienzgründen die maximale Laufzeit statt der zurückgelegten Strecke festgelegt. Am Ende jeder Messung werden die Papiersubstrate getrocknet und ausgewertet. Die verschiedenen Schritte einer Messung sind schematisch in Abbildung 31 dargestellt.

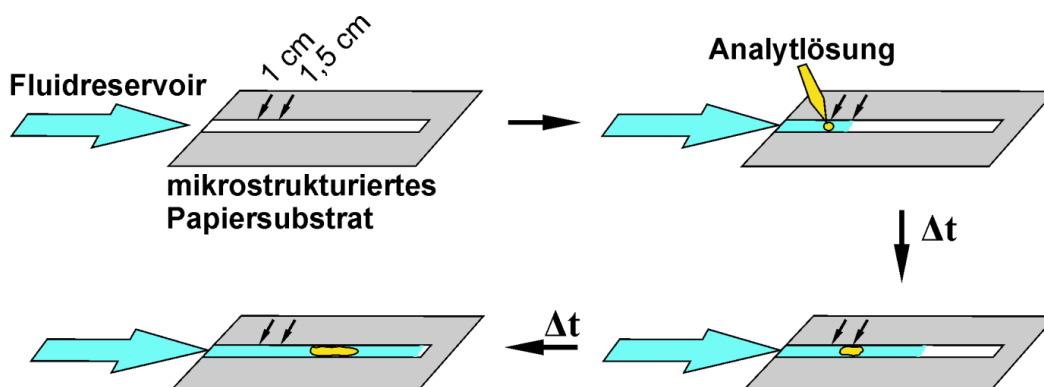


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Verlaufs eines Retentionsexperiments. Nach Kontaktierung des Fluidreservoirs mit dem mikrostrukturierten Papiersubstrat beginnt die Fluidfront kapillarkraftgetrieben durch den hydrophilen Kanal zu wandern. Sobald die Front die zweite Pfeilmarkierung erreicht hat, wird mit Hilfe einer Eppendorfpipette die Analytlösung (in diesem Beispiel Tartrazinlösung) an der ersten Pfeilmarkierung aufgetragen. Mit der Zeit wandern Fluidfront Farbstofffront weiter durch den Kanal. Eine Verbreiterung des zu Beginn sehr definierten Farbspots ist üblicherweise zu beobachten. Für Farbstoffexperimente wird das Experiment abgebrochen, sobald die Fluidfront das Ende des mikrostrukturierten Kanals erreicht hat.^[132]

Datenerhebung in Farbstoffexperimenten

Zur Datenerhebung werden zunächst alle Kanäle mit einem herkömmlichen Officescanner als farbige TIFF-Datei mit hoher Auflösung (600x600) digitalisiert (Abbildung 32A). Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *Image J2x* wird zunächst der Farbkanal des Bildes herausgefiltert, der den Farbspot gegen den Hintergrund am deutlichsten hervortreten lässt (für Tartrazin: Blau; für Methylenblau: Rot) (Abbildung 32B). Anschließend wird ein Diagramm der Grauwerte in Abhängigkeit der Kanalposition zwischen der ersten Pfeilmarkierung des Kanals und dem Kanalende erstellt. Ein hoher Grauwert entspricht dabei keinem bis wenig Farbstoff, während ein Grauwert von nahe 0 eine große Menge Farbstoff anzeigt (Abbildung 32C). Aus diesem Diagramm

können die minimal und maximal zurückgelegte Strecke der Farbstoffmoleküle im Kanal abgelesen werden: Als minimal von Farbmolekülen zurückgelegte Strecke d_{\min} ist der Abstand zwischen der ersten Pfeilmarkierung und dem Punkt im Diagramm definiert, an dem der Grauwert im Vergleich zum vorherigen Rauschen deutlich abnimmt (Abbildung 32C). Als maximal von den Farbstoffmoleküle zurückgelegte Strecke d_{\max} ist der Abstand zwischen der ersten Pfeilmarkierung und dem Punkt im Diagramm definiert, an dem der Grauwert vom Minimum der Kurve wieder sprunghaft ansteigt (Abbildung 32C). Die in Zoll ermittelten Werte werden in Zentimeter umgerechnet. Die während der Farbstoffmigration vom Fluid zurückgelegte Strecke d_{Fluid} kann stets zwischen der zweiten Pfeilmarkierung und dem Kanalende abgelesen werden und entspricht 3,5 cm.

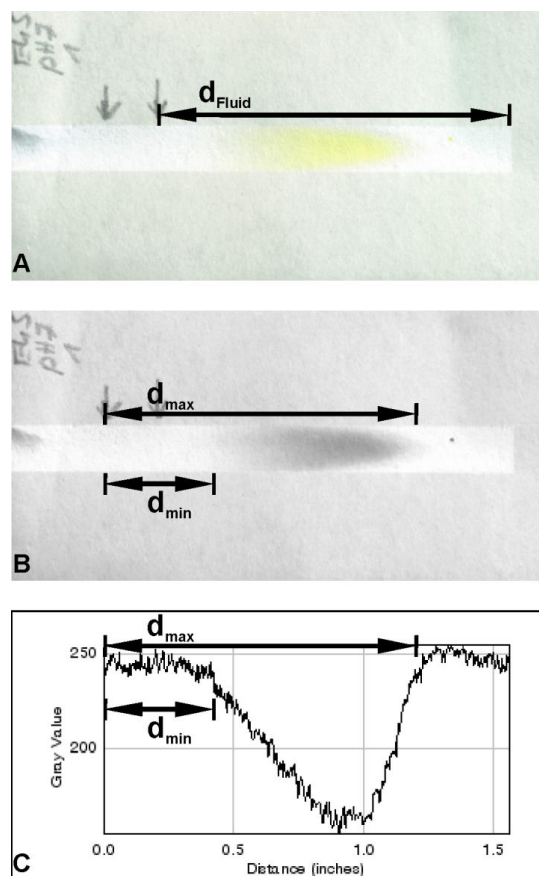


Abbildung 32: (A) Farbscan eines Papiersubstrats nach einem Retentionsexperiment. Die zurückgelegte Strecke der Fluidfront d_{Fluid} nach dem Zeitpunkt der Probenaufgabe ist markiert. (B) Blauer Farbkanal des Farbscans herausgefiltert mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware *Image J2x*. Mit bloßem Auge ist der Endpunkt von d_{\max} relativ deutlich zu erkennen, während für die Definition des Endpunktes der Strecke d_{\min} das Diagramm der Grauwerte erforderlich ist. (C) Diagramm der Grauwerte als Funktion der Position im Kanal ermittelt mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *Image J2x*. Der Endpunkt für die Strecke d_{\max} ist deutlich am Endpunkt des steilen Anstiegs der Kurve auf das Ausgangslevel des Grauwerts zu erkennen. Die Strecke d_{\min} endet sobald ein deutlicher Abfall des Grauwerts zu beobachten ist.^[132]

Datenerhebung in Proteinexperimenten

Da im Gegensatz zu den Farbstoffexperimenten das fluoreszenzmarkierte Protein nicht mit bloßem Auge sichtbar ist, erfolgt die Digitalisierung der Proben mithilfe eines UV-Transilluminators. Eine UV-Lampe mit breitem Spektrum regt das TAMRA-markierte Protein in den Papiersubstraten von unten zur Fluoreszenz an (Abbildung 33A). Eine Kamera nimmt das entstehende Bild von oben auf. Dabei ist zu beachten, dass die verwendeten Papiersubstrate eine möglichst einheitliche nicht zu

hohe Grammatatur aufweisen sollten, da die UV-Strahlen es ansonsten nicht ausreichend durchdringen können. Um die Vergleichbarkeit verschiedener Aufnahmen beurteilen zu können, wird ein Standard mit aufgenommen. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *Image J2x* wird anschließend ein Diagramm der Grauwerte in Abhängigkeit der Kanalposition zwischen der ersten Pfeilmarkierung des Kanals und dem Kanalende erstellt. Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der invertierten Helligkeiten im Gegensatz zu den Farbstoffexperimenten ein hoher Grauwert eine große Menge Protein repräsentiert (Abbildung 33B).

Anhand dieses Diagramms werden die minimal und maximal zurückgelegte Strecke der Proteine ermittelt werden. Da diese aufgrund der invertierten Helligkeiten nicht so eindeutig zu definieren ist, wie in den Farbstoffexperimenten, werden die Daten der Diagramme in die Analysen- und Darstellungssoftware *Origin* exportiert und die Kurve angefitet. Im Analysen- und Darstellungsprogramm *Grapher* werden die Nullstellen der so ermittelten Funktionen berechnet und als Grenzen der Proteinspots definiert. Die in Pixel ermittelten Werte werden in Zentimeter umgerechnet. Als Referenz dient die nach 12 min zurückgelegte Strecke des Fluids. Diese kann mit Hilfe eines Lineals zwischen der zweiten Pfeilmarkierung und der Markierung der Fluidfront ausgemessen werden.

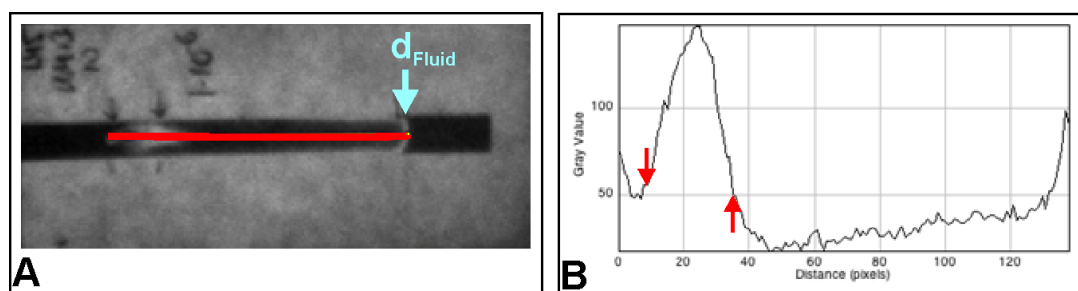


Abbildung 33: (A) Fotografie eines Papiersubstrats nach einem Retentionsexperiment unter UV-Bestrahlung. Die im Diagramm der Grauwerte als Funktion der Position im Kanal aufgetragene Strecke ist in Rot markiert. Die in 12 min von der Fluidfront zurückgelegte Strecke ist mit einem hellblauen Pfeil markiert. (B) Das Diagramm der Grauwerte als Funktion der Position im Kanal wurde mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *Image J2x* ermittelt. Über den mit roten Pfeilen markierten Bereich wird in der Analysen- und Darstellungssoftware *Origin* ein kubischer Fit gelegt. Dessen Nullstellen werden als minimal bzw. maximal zurückgelegte Strecke des Proteins d_{\min} bzw. d_{\max} definiert.^[133]

Auswertung

Zur Auswertung der Retentionsexperimente wurden zunächst zwei Größen definiert. Der Retentionsfaktor R_f ist ein aus den Grundlagen der Chromatographie bekannter Parameter (Abschnitt 3.2.1). Er ergibt sich als Quotient aus maximaler Laufstrecke d_{\max} und Laufstrecke des Fluids d_{Fluid} (Gleichung 10). Als Zahlenwert erleichtert er den Vergleich der Retention verschiedener Analyten bzw. des gleichen Analyten unter verschiedenen Bedingungen. Üblicherweise kann der Retentionsfaktor einen Wert von 1 nicht überschreiten. Ein hoher Retentionsfaktor lässt auf eine geringe Retention der Analytmoleküle schließen.

$$R_f = \frac{d_{\max}}{d_{\text{Fluid}}} \quad (10)$$

Die Bandenverbreiterung B_v ist definiert als die Differenz aus maximaler Laufstrecke und minimaler Laufstrecke des Analyten normiert auf die zugehörige maximale Laufstrecke (Gleichung 11). Per Definition kann sie einen Wert von 1 nicht überschreiten. Qualitativ erlaubt sie eine Beurteilung darüber, wie stark sich der aufgetragene Analytspot ausgehend von der Auftragungsposition entlang

des Kanals verteilt. Eine Bandenverbreiterung von 1 bedeutet demnach, dass sich der Analyt über den Kanal vom Auftragungsort bis zur maximal erreichten Laufweite verteilt hat. Generell spricht eine hohe Bandenverbreiterung für eine erhöhte Retention.

$$B_V = \frac{d_{max} - d_{min}}{d_{max}} \quad (11)$$

Fehlerberechnung in Farbstoffexperimenten

In die Fehlerbetrachtung der Farbstoffexperimente sollen zwei Größen einfließen: Fehler, die sich in der Durchführung der Experimente ergeben, sowie Fehler, die die Datenerhebung bedingen.

Der "Fehler der Durchführung" würdigt die Tatsache, dass im Rahmen der Experimente statistische Unregelmäßigkeiten auftreten können. Beispielsweise kann Papier nicht als vollständig homogenes Material angesehen werden oder die Position der Kontaktierung des Kanals mit dem Fluidreservoir kann bedingt durch den Versuchsaufbau leicht variieren. Fehler dieser Art sollen durch die Standardabweichung σ einer im Regelfall Dreifachbestimmung ($n = 3$) als Abweichung vom Mittelwert \bar{x} abgeschätzt werden (Gleichung 12). x_i steht dabei für einen Messwert. Die Berechnung erfolgt für R_f und B_V äquivalent.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (12)$$

Der "Fehler der Datenerhebung" würdigt Messungenauigkeiten, die zu Fehlern bei der Erhebung der Werte für d_{fluid} , d_{min} und d_{max} führen. Dabei wird für die Ablesungenauigkeit des Lineals bei der Messung von Δd_{fluid} 0,1 cm angenommen. Für Ungenauigkeiten durch Rauschen im Grauwert-Diagramm wird für Δd_{max} und Δd_{min} ebenfalls jeweils ein Fehler von 0,1 cm angenommen. Mit Hilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung ergibt sich daraus der Fehler von R_f nach Gleichung 13 und der Fehler von B_V nach Gleichung 14.

$$G_{R_f} = \sqrt{\left(\left|\frac{1}{d_{fluid}}\right| \cdot \Delta d_{max}\right)^2 + \left(\left|\frac{-d_{max}}{d_{fluid}^2}\right| \cdot \Delta d_{fluid}\right)^2} \quad (13)$$

$$G_{B_V} = \sqrt{\left(\left|\frac{-d_{min}}{d_{max}^2}\right| \cdot \Delta d_{max}\right)^2 + \left(\left|\frac{-1}{d_{max}}\right| \cdot \Delta d_{min}\right)^2} \quad (14)$$

Da beide Fehlertypen in ähnlich starkem Maße Einfluss auf das Messergebnis nehmen, wird, um beide Fehlertypen ausreichend zu würdigen, der Gesamtfehler als Summe der beiden Fehlertypen definiert (Gleichung 15, 16).

$$\Delta R_f = \sigma_{R_f} + G_{R_f} \quad (15)$$

$$\Delta B_V = \sigma_{B_V} + G_{B_V} \quad (16)$$

Nicht erfasst werden können in der beschriebenen Fehlerberechnung systematische Fehler. Als Beispiel soll eine Beobachtung, die in Bezug auf den Fluidtransport in mikrostrukturierten Kanälen gemacht wurde, beschrieben werden. Die Fluidfront bildete nach kurzer zurückgelegter Distanz im mikrostrukturierten, unbeschichteten Kanal stets eine konvexe Fluidfront aus. Dieses Verhalten ist in Anlehnung an entsprechende Beobachtungen in Nitrocellulosemembranen^[5] und Filterpapieren^[52, 134] vermutlich auf einen materialbedingten, verlangsamten Fluidfluss entlang der Kanalränder zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass ein hierin begründeter, möglicher

Fehler systematisch und damit einheitlich für alle Proben ist. Daher kann er beim Vergleich der R_F - und B_V -Werte der Proben untereinander vernachlässigt werden.

Fehlerberechnung in Proteinexperimenten

In der Fehlerbetrachtung der Proteinexperimente wird im Gegensatz zu den Farbstoffexperimenten nur der "Fehler der Durchführung" in Form der Standardabweichung (Gleichung 12) gewürdigt. Es wird davon ausgegangen, dass der "Fehler der Datenerhebung" in diesem Fall gegenüber dem "Fehler der Durchführung" vernachlässigt werden kann, da die Bestimmung der Proteinspotgrenzen d_{\min} und d_{\max} durch das Fitten des Grauwertdiagramms und der Nullstellenbestimmung sehr exakt erfolgt. Der Fehler der während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegten Strecke d_{Fluid} ergibt sich als Summe aus dem "Fehler der Datenerhebung" und dem "Fehler der Durchführung", da diese Strecken nicht digital, sondern manuell gemessen werden und folglich ungenauer definiert sind.

3.3.2. Vertikales System

Strukturierung des Substrats

Zur Mikrostrukturierung der Papiersubstrate wird die Methode des "Cuttings" verwendet (Abschnitt 1.1). Diese Methode wird gewählt, da sie die einzige universelle, also auch für Lösungsmittel mit sehr geringer Oberflächenspannung wie Alkohole geeignete, Mikrostrukturierungsmethode ist. Zum Zuschneiden wurde eine Papierschneidemaschine verwendet. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wird erneut eine 0,4 cm breite Kanalstruktur verwendet. Die Streifenlänge beträgt 9 cm. Bei 1 cm (1. Markierung), 1,5 cm (2. Markierung) und 6,5 cm (3. Markierung) wird die Struktur jeweils mit einer Markierung versehen. Anschließend wird der Streifen von oben bis zur Markierung bei 6,5 cm mittig eingeschnitten.

Versuchsaufbau

Ein 100 mL Becherglas wird mit exakt 10 mL des zu untersuchenden Fluids gefüllt. In Vorexperimenten wurde herausgefunden, dass leichte Schwankungen im Füllstand keinen Einfluss auf die Laufweite der Fluidfront haben. Trotzdem sollten starke Schwankungen vermieden werden. Anschließend wird die "Kammer" mit einer Petrischale, die mittig mit einer Aussparung versehen ist, verschlossen. Durch die Aussparung kann das Papiersubstrat gesteckt und durch ein Abknicken der beiden eingeschnittenen Flügel in einer definierten Position fixiert werden (Abbildung 34). Die Auftragung des definierten Probenvolumens von $0,5 \mu\text{L}$ Analytlösung erfolgt mit Hilfe einer Eppendorfpipette.

Durchführung

Das Experiment startet, sobald die Petrischale mit dem fixierten Papiersubstrat auf das Becherglas gesetzt wird und so der Papierstreifen in das Fluidreservoir eintaucht. Dabei ist darauf zu achten, dass das Substrat möglichst mittig positioniert ist und keinesfalls die Becherglaswände berührt. Eine Stoppuhr wird gestartet. Sobald die Fluidfront die 2. Markierung bei 1,5 cm erreicht hat, wird die Petrischale abgenommen, die Zeitnahme unterbrochen und die Analytlösung mittig an der 1. Markierung aufgetragen. Dabei dient eine zweite Petrischale als Untergrund. Anschließend wird das Papiersubstrat erneut mit dem Fluidreservoir kontaktiert, indem die Petrischale wieder auf das Becherglas aufgesetzt wird. Die Zeitnahme wird fortgesetzt.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wird das Experiment nach 12 min abgebrochen, indem der Kontakt des Papiersubstrats zum Fluidreservoir unterbrochen wird. Die Position der Fluidfront zu

diesem Zeitpunkt wird markiert. Am Ende jeder Messung wird das Papiersubstrat getrocknet und ausgewertet.

Die **Datenerhebung und Auswertung** erfolgen entsprechend der für Farbstoffe vorgestellten Vorgehensweise (Abschnitt 3.3.1).

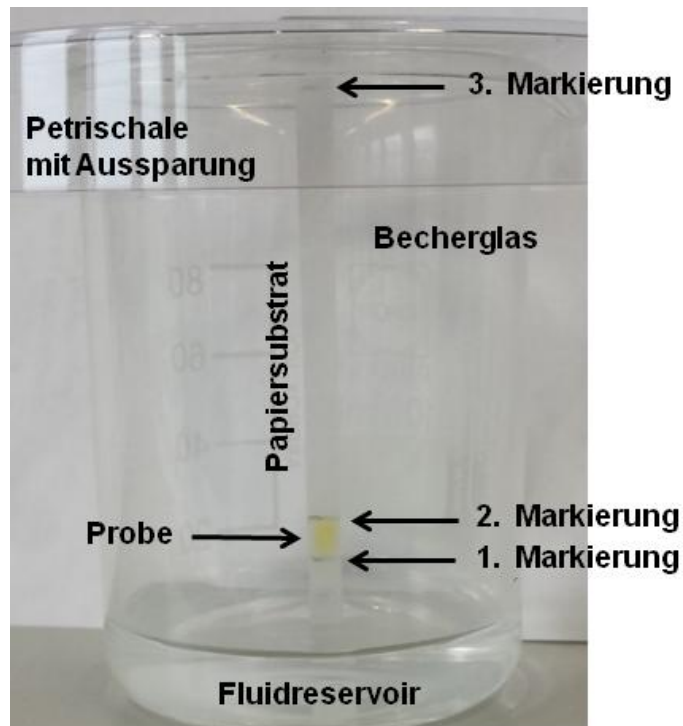


Abbildung 34: Ein 100 mL Becherglas verschlossen mit einer Petrischale mit Aussparung dient als Versuchsaufbaus für Retentionsexperimente im vertikalen System. 10 mL des zu untersuchenden Fluids werden eingefüllt. Das Papiersubstrat wird durch die Aussparung bis zur dritten Markierung eingesteckt und durch Umklappen der eingeschnittenen Flügel in dieser Position fixiert. Sobald die Fluidfront die zweite Markierung erreicht hat, wird die Probe (hier zur Veranschaulichung gelbe Farblösung) an der ersten Markierung aufgetragen. Jedes Experiment läuft exakt 12 min.

4. Charakterisierung des verwendeten Substratmaterials Papier

Zellstoff ist ein Naturprodukt und unterliegt ebenso wie das daraus hergestellte Papier natürlichen und dem Herstellungsprozess unterliegenden Schwankungen.^[135] Folglich können Literaturwerte verschiedenster Größen zur Charakterisierung der verwendeten Papiere nur einen Richtwert sein. Daher wurden zunächst vergleichend grundlegende Eigenschaften der verwendeten Zellstoffe (Baumwollinters und Eukalyptussulfat) bzw. der daraus hergestellten Papiere (handgebildetes Papier, sowie kommerziell erhältliches Roth 15A Filterpapier) untersucht, welche im folgenden Abschnitt beschrieben sind. In den anschließenden Kapiteln konnten hieraus Rückschlüsse auf die Ergebnisse der Retentionsexperimente gezogen werden. Ein besonderer Fokus wurde zunächst auf die (Oberflächen-)Beschaffenheit der Cellulosefasern als Grundlage für ihre Wechselwirkung mit Farbstoffen und Proteinen gelegt. Neben der Ermittlung typischer Kennzahlen wie Faserlänge, Feinstoffgehalt oder Fibrillierungsgrad wurde vor allem die Oberflächenladung des Faserstoffs mittels Zetapotentialmessungen (Abschnitt 4.3) untersucht. Abschließend wurde die Papierstruktur als zentrale Einflussgröße des mikrofluidischen Flusses (Abschnitt 4.4) genauer betrachtet und mittels Quecksilberporosimetrie charakterisiert.

4.1. Chemische Beschaffenheit der Fasern

4.1.1. Elementaranalyse

Zunächst sollte mittels Elementaranalyse die grundlegende Zusammensetzung der verschiedenen Papiere verglichen werden (Tabelle 2). Zentrale Fragestellung dabei war, ob der Zusatz von Nassfestmitteln bzw. die unterschiedlichen Ausgangszellstoffe und Aufschlussprozess unterschiedliche Zusammensetzungen bedingen, die möglicherweise einen Einfluss auf die Retention von Analyten haben könnten.

Tabelle 2: Messergebnisse der Elementaranalyse von Roth 15A Filterpapier und Papieren aus Eukalyptussulfatfasern sowie Baumwollintersfasern.

Probe	Gehalt C [%]	Gehalt H [%]	Gehalt N/S [%]	Gehalt O [%]
Filterpapier Roth 15A	41,7	6,6	0,0	51,7
Eukalyptussulfatpapier (SW37)	41,1	6,5	0,0	52,3
Baumwollinterspapier (SW29)	41,7	6,5	0,0	51,8

Im Vergleich der detektierten Elementkonzentrationen mit den Literaturwerten nach Payen^[66] (Abschnitt 3.1.1) fiel auf, dass der Kohlenstoffgehalt der Proben mit 41–42 % etwas niedriger lag als der Literaturwert von 44–45 %. Stattdessen lag der Sauerstoffgehalt der Proben mit 51,5–52,5 % etwas höher als der Literaturwert von 48,5–50,0 %. Der Wasserstoffgehalt der Proben lag im Rahmen des Messfehlers von $\pm 0,3$ % im Bereich des Literaturwertes von 6,0–6,5 %.

Für diese Abweichungen können einige Erklärungsansätze gefunden werden. Zunächst könnten die Abweichungen der Proben von den Literaturwerten in der Art des Aufschlussprozesses begründet liegen. Sowohl beim Sulfataufschluss der Eukalyptusfasern als auch beim alkalischen Aufschluss der Baumwolle führen Nebenreaktionen zu einer erhöhten Zahl an Carboxylgruppen (Abschnitt 3.1.2). Dies könnte den erhöhten Anteil an Sauerstoff- gegenüber Kohlenstoffatomen erklären. Diese Erklärung korrelierte auch mit der Beobachtung, dass im Eukalyptussulfatpapier der Anteil an Sauerstoff im Vergleich zu den beiden baumwollintersbasierten Papieren etwas erhöht lag. Darüber

hinaus ist der natürliche Hemicellulosegehalt in Eukalyptusfasern höher als in Baumwollintersfasern. Dies könnte einen erhöhten Prozentsatz an Sauerstoffatmen durch einen höheren Anteil an sauerstoffreichen Uronsäuren als Zwischenprodukt des Hemicelluloseabbaus begründen (Abschnitt 3.1.2). Schließlich könnte auch eine Lagerung der Rohstoffe den erhöhten Sauerstoffgehalt gegenüber den Literaturwerten erklären. Abhängig von den Lagerbedingungen wird die Hydroxylgruppe an C6 unterschiedlich stark oxidiert, was den relativen Sauerstoffgehalt effektiv erhöht.

Es fiel weiterhin auf, dass in keiner Probe Stickstoff detektiert wurde, obwohl das Nassfestmittel der Filterpapierprobe Stickstoffatome enthält (nach Herstellerangaben^[61] > 2 % PAE-Harz). Möglicherweise lag die verwendete Menge an Nassfestmittel unterhalb der Detektionsgrenze (15 ppb) des Gerätes. Auch Schwefelatome konnten trotz des verwendeten Sulfatverfahrens beim Aufschluss von Eukalyptusfasern nicht detektiert werden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass aufgrund der geringen Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Proben diesbezüglich kein deutlicher Einfluss auf die Retention der Analyte zu erwarten war.

4.1.2. FTIR-Analyse

Zunächst wurden die drei verwendeten Papiersorten vergleichend mittels FTIR untersucht. Der Vergleich der Spektren der drei Papiersorten (Abbildung 35) machte deutlich, dass alle zentralen Banden in allen Spektren identisch waren und funktionellen Gruppen und deren Schwingungen zugeordnet werden konnten (Tabelle 3). Folglich waren chemische Unterschiede der Papierproben, z.B. aufgrund der eingesetzten Nassfestmittel im Filterpapier, mittels FTIR-Spektren nicht zu detektieren. Die Analyse konnte daher nicht zur Begründung möglicher Retentionsunterschiede (Abschnitt 5.3.2) herangezogen werden. Allerdings diente sie als Referenzmessung für den Vergleich mit modifizierten Papieren (Abschnitt 6.1.2).

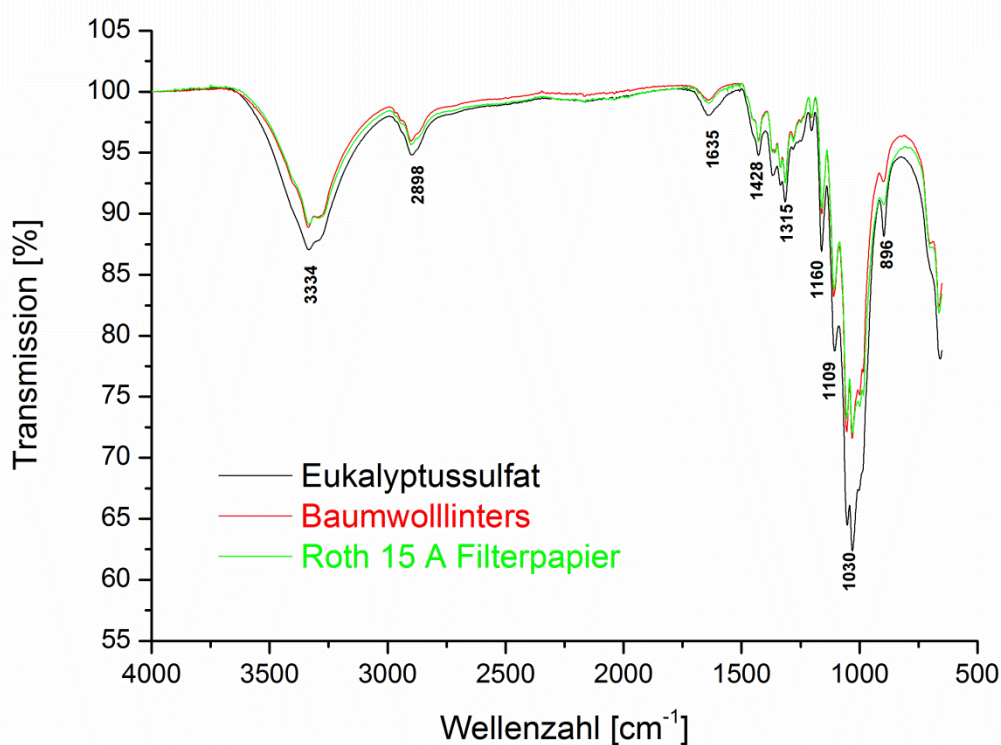


Abbildung 35: FTIR-Spektren drei verschiedener Papierproben im Vergleich (Schwarz: Eukalyptussulfatpapier, Rot: Baumwollinterspapier, Grün: Roth 15A Filterpapier).

Tabelle 3: Zuordnung der dominanten Schwingungen der FTIR-Analyse von Papier.

λ (gemessen) cm^{-1}	λ (Literatur) cm^{-1}	Zugeordnete Schwingung
3334	3450–3340 ^[136] 3400–3000 ^[137]	Streckschwingungen H-gebundener OH-Gruppen
2898	2904 ^[136] 2900 ^[137]	C-H Streckschwingungen
1635	1647 ^[137]	Deformationsschwingungen von adsorbiertem Wasser auf Cellulose
1428–1315 1160	1431, 1369, 1320, 1165 ^[136] 1430 ^[137]	CH ₂ Deformationsschwingung
1109	1115 ^[136] 1150–1070 ^[138]	C-O-C (Ether) Streckschwingungen
1030	1070 ^[136] 1150–1040 ^[138]	C-O Deformationsschwingung primärer Alkohole
896	897 ^[136] 898 ^[137]	C-O-C Streckschwingungen

4.2. Faserbeschaffenheit

Die Beschaffenheit von Papierfasern kann nach Niskanen *et al.*^[68] neben vielen anderen Eigenschaften auch die Wechselwirkung von Papierfasern mit Additiven beeinflussen. Folglich wurde vermutet, dass sie auch einen Einfluss auf die Retention der untersuchten Analyten haben könnten. Daher sollten durch eine Faseranalyse die zentralen Eigenschaften der verwendeten Zellstoffmaterialien untersucht und untereinander sowie mit Literaturwerten verglichen werden (Tabelle 4). Zu beachten war, dass Parameter wie Faserlänge, -breite, -krümmung, Feinstoffanteil oder Fibrillierung entscheidend von der Zellstoffquelle und -aufarbeitung abhängen. Daher war ein Vergleich mit Literaturwerten nur begrenzt aussagekräftig.

Tabelle 4: Ermittelte Daten der Faseranalyse für gemahlenen Baumwollinterszellstoff, frisch aufgeschlagener Eukalyptussulfatzellstoff sowie redispergierte Blätter von Roth 15A Filterpapier im Vergleich zu bekannten Literaturwerten.

	Baumwollinters		Eukalyptussulfat		Roth 15A
	Messung	Literatur	Messung	Literatur	Messung
Lc (l) (ISO) [mm]	1,233 ± 0,078	2–6 ^[77]	0,908 ± 0,005	1,1 ^[68]	0,700 ± 0,006
Faserbreite [µm]	19,3 ± 0,6	17–27 ^[77]	11,9 ± 0,0	20,0 ^[68]	20,7 ± 0,1
Krümmung [%]	17,73 ± 1,21	17,4 ^[26]	16,24 ± 0,20	15,7 ^[26]	11,65 ± 0,35
Feinstoffanteil A [%]	20,92 ± 0,73		15,20 ± 0,11		23,71 ± 0,22
Fibrillierung [%]	2,79 ± 0,30	4,9 ^[26]	1,25 ± 0,04	4,7 ^[26]	2,23 ± 0,05

Die *mittlere Faserlänge* der Faserstoffe war allgemein etwas kürzer als die Literaturwerte erwarten ließen. Es wird vermutet, dass dies im individuellen Aufschlussprozess und der Verarbeitung der Fasern begründet liegt.^[68] Eukalyptussulfatfasern waren kürzer und *schmäler* als Baumwollintersfasern. Die daraus resultierende geringere Kontaktfläche der Fasern bedingte eine geringere Stabilität der Eukalyptussulfatpapiere. Die Faserlänge nahm Einfluss auf die Papierdichte, die wiederum relevant für die Geschwindigkeit des Fluidtransports war. Daher sollte diese Kenngröße bei der Untersuchung des Fluidtransports im Papier nicht vernachlässigt werden.^[33] Die *Krümmung* der Fasern war für alle drei Faserstoffe sehr ähnlich und im Bereich der Literaturwerte. Daher wurde die Krümmung in weiteren Betrachtungen vernachlässigt.

Besonders relevant für die Wechselwirkung mit verschiedenen Stoffen und folglich für die Retention waren der *Feinstoffgehalt* und die *Fibrillierung* der Fasern. Ein erhöhter Feinstoffgehalt erhöhte die Wechselwirkung der Fasern untereinander, aber auch die Wechselwirkung mit anderen Stoffen aufgrund einer höheren spezifischen Oberfläche.^[68] Der Feinstoffgehalt der verschiedenen Proben unterschied sich nicht wesentlich, war aber für Filterpapier am höchsten, gefolgt von Baumwollintersfasern. Dies könnte in deren Mahlung begründet liegen. Die Mahlung (24,5 ± 0,7 °SR) der Baumwollintersfasern wäre auch eine Erklärung für ihre vergleichsweise starke Fibrillierung. Eine höhere Fibrillierung sorgt ebenso wie ein erhöhter Feinstoffgehalt für eine erhöhte spezifische Oberfläche der Fasern und so neben einer höheren Papierstabilität für eine höheres Potential zur Wechselwirkung mit anderen Stoffen. Folglich sollte aufgrund von Feinstoffgehalt und Fibrillierung mit einer erhöhten Retention der Farbstoffe an Baumwollintersfasern im Vergleich zu Eukalyptussulfatfasern gerechnet werden. Die Retentionsergebnisse (Abschnitt 5.3.2) spiegelten diesen Trend allerdings nicht wieder. Daher wird vermutet, dass der Einfluss der Faserbeschaffenheit eine untergeordnete Rolle spielt und vernachlässigt werden kann.

4.3. Ladungscharakteristika der Fasern (Zetapotentialmessung)

Garnier *et al.*^[6] beschrieben neben Größenausschluss vor allem die Adsorption und dessen Spezialfall den Ionenaustausch als relevante Parameter bei der Auftrennung verschiedener Analyten in Papier (Abschnitt 3.2.1). Folglich erschien es zur allgemeinen Beurteilung der Retention geladener Analyte relevant, die Faserladung unter den verwendeten Messbedingungen zu kennen. Als Maß für die Ladung von Cellulosefasern wird üblicherweise das Potential an der Grenzschicht zwischen Stern-Schicht und Gouy-Chapman-Region, das sogenannte Zetapotential ξ , verwendet (Details in Abschnitt 9.4.3).

Nach Bhardwaj *et al.*^[139] ist die Ladung von Cellulosefasern abhängig von Faktoren wie dem Aufschlussprozess, dem Bleichvorgang, dem pH-Wert oder auch der Elektrolytkonzentration der Zellstoffsuspension. Aufgrund dieser zahlreichen Einflussgrößen konnten Literaturwerte (vgl. Abschnitt 3.1.2) nur als Richtwerte herangezogen werden bzw. sind teilweise (vgl. Roth 15A Filterpapier) nicht bekannt. Folglich wurde für die drei verwendeten Papiersorten Eukalyptussulfatzellstoff, gemahlener Baumwollinterszellstoff und redispergiertes Roth 15A Filterpapier das Zetapotential bestimmt. Da Untersuchungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt wurden, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf das Zetapotential der Fasern bei konstant eingestellter Leitfähigkeit gemessen (Details zur Durchführung in Abschnitt 9.4.3).

Eukalyptussulfat

In Abbildung 36 ist das Zetapotential der Eukalyptussulfatzellstoffsuspension in Abhängigkeit des pH-Werts bei konstanter Leitfähigkeit von $6,4 \text{ mS cm}^{-1}$ dargestellt. Das gemessene Zetapotential fiel bis pH 5/6 kontinuierlich ab, was auf die Deprotonierung der Carboxylgruppen des Zellstoffs (pK_a -Wert bei 4,6^[140]) zurückgeführt werden kann. Bis zu einem pH-Wert von 10/11 veränderte sich das Zetapotential anschließend im Rahmen der Fehler nicht. Dies wird darauf zurückgeführt, dass alle zugänglichen Carboxylgruppen deprotoniert vorliegen. Bei pH 12 nahm das Potential noch einmal deutlich ab. Dies könnte in der einsetzenden Deprotonierung der Hydroxylgruppen der Glucoseeinheiten ($\text{pK}_a = 12,35$ ^[141]) der Cellulose begründet liegen.

Der beschriebene tendenzielle Verlauf des Zetapotentials in Abhängigkeit des pH-Werts korrelierte mit den in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Literaturwerten.^[75] Die Absolutwerte waren nicht vergleichbar, da die eingestellte Leitfähigkeit mit $6,4 \text{ mS cm}^{-1}$ über der Leitfähigkeit der Literaturwerte von 2 und 4 mS cm^{-1} lag. Ungünstig war die Tatsache, dass gerätebedingt für $\text{pH} < 2$ und $\text{pH} > 12$ kein Zetapotential ermittelt werden konnte. So konnte zwar der Trend für die Auswertung bei sehr geringen bzw. sehr hohen pH-Werten extrapoliert werden, eine klare Aussage konnte allerdings nicht getroffen werden. Dies war vor allem für pH 1, bei dem ein Zetapotential um 0 mV erwartet wird, problematisch. Bereits geringe Änderungen könnten in diesem Bereich zu einem Vorzeichenwechsel führen, der die Wechselwirkung geladener Moleküle deutlich beeinflussen würde.

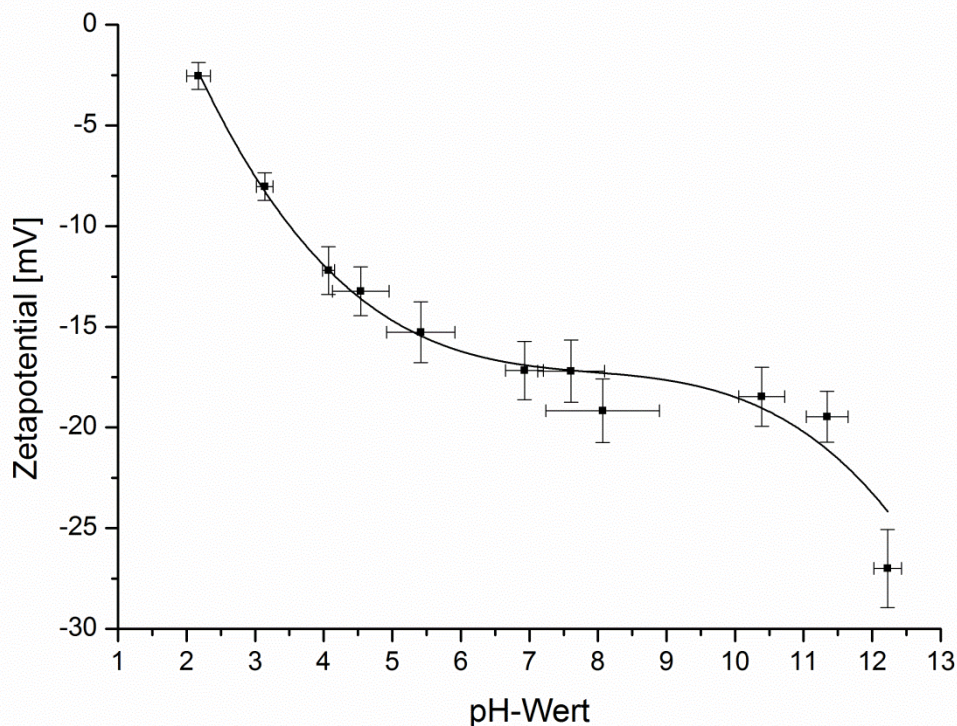


Abbildung 36: Zetapotential (Strömungspotential) einer Eukalyptussulfatzellsuspension als Funktion des pH-Werts bei $\chi = 6,4 \text{ mS cm}^{-1}$.^[132]

Baumwolllinters

In Abbildung 37 ist das Zetapotential einer gemahlenen Baumwolllinterszellsuspension in Abhängigkeit des pH-Werts bei konstanter Leitfähigkeit von $6,6 \text{ mS cm}^{-1}$ dargestellt. Der tendenzielle Verlauf des Zetapotentials entsprach dabei dem der Eukalyptussulfatzellsuspension und kann äquivalent begründet werden. Er korrelierte mit den in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Literaturwerten.^[78] Auch hier konnten die Absolutwerte der Literatur allerdings nicht mit den experimentell ermittelten Werten verglichen werden, da sie bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen gemessen wurden.

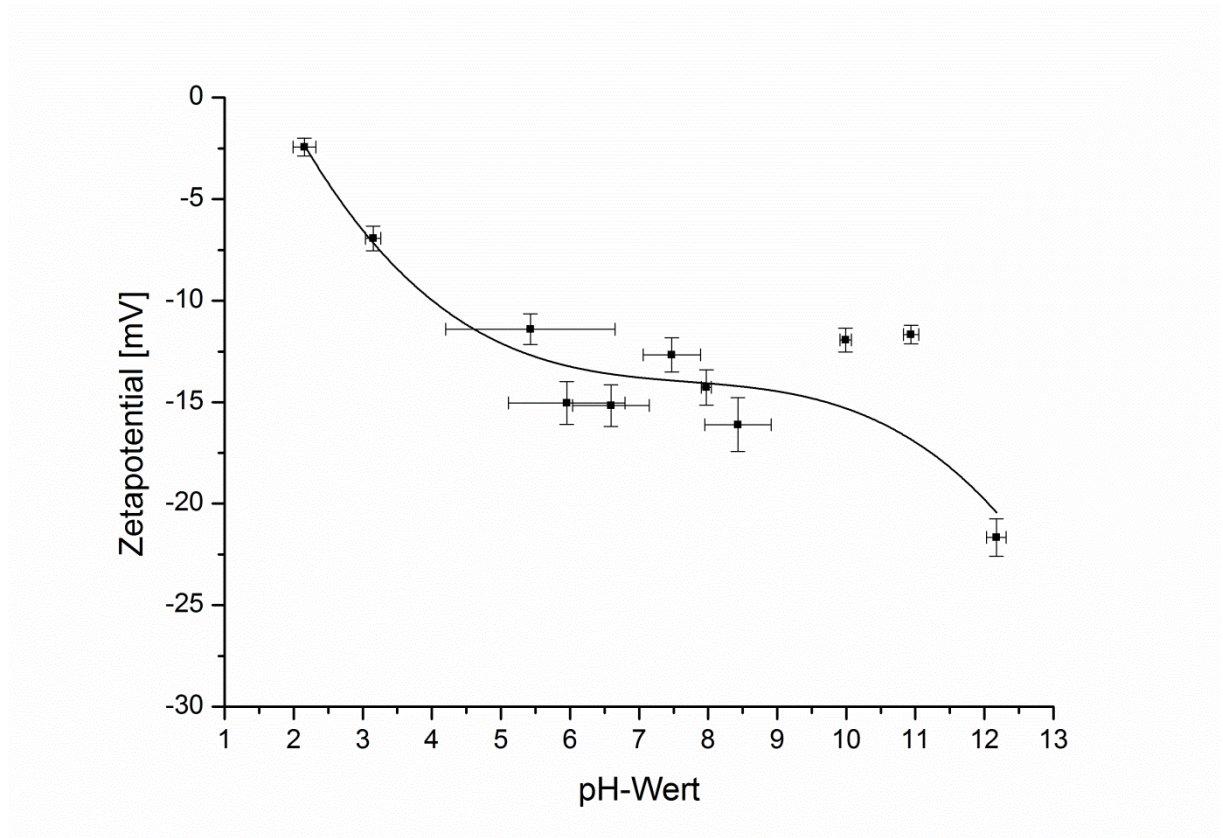


Abbildung 37: Zetapotential (Strömungspotential) der Baumwollinterszellstoffsuspension als Funktion des pH-Werts bei $\chi = 6,6 \text{ mS cm}^{-1}$.

Filterpapier Roth 15A

In Abbildung 38 ist das Zetapotential von redispergiertem Roth 15A Filterpapier in Abhängigkeit des pH-Werts bei konstanter Leitfähigkeit von $6,6 \text{ mS cm}^{-1}$ dargestellt. Das gemessene Zetapotential fiel kontinuierlich über den gesamten gemessenen pH-Bereich ab, wobei zwischen pH 11 und pH 12 ein deutlicher Sprung zu beobachten war. Dieser konnte, wie bei den anderen beiden Zellstoffarten, ebenfalls auf die Deprotonierung der Hydroxylgruppen der Cellulose zurückgeführt werden. Im Gegensatz zum Ausgangsmaterial (Baumwollinters) war die Suspension des redispergierten Filterpapiers bei geringen pH-Werten positiv geladen und überschritt erst zwischen pH 3 und pH 4 den Grenzwert von 0 mV. Diese Verfälschung des Zetapotentialverlaufs des Ausgangsmaterials Baumwollinters könnte auf den Einsatz von Nassfestmitteln im Filterpapier zurückgeführt werden. In Roth 15A Filterpapier wird PAE-Harz als Nassfestmittel^[61] verwendet. Die vernetzende Zwischenstufe dieses Nassfestmitteltyps enthält ein quartäres Amin (Abschnitt 3.1.3). Wenige, unvernetzte Gruppen des Nassfestmittels könnten bei stark saurem pH-Wert so für ein positives Zetapotential sorgen. Die positive Ladung dieser Gruppen fiel bei sehr sauren pH-Werten ins Gewicht und wurde durch die zunehmende Zahl negativer Ladungen durch deprotonierte Carboxylgruppen der Cellulosefasern bei ansteigendem pH-Wert überdeckt. Außerdem könnten bei stark saurem pH-Wert die vernetzten tertiären Amine protoniert werden und so temporär eine positive Ladung aufweisen. Bei basischen pH-Werten wären diese Gruppen deprotoniert und folglich nicht länger geladen. Für redispergiertes Roth 15A Filterpapier sind keine Literaturwerte zum Vergleich bekannt.

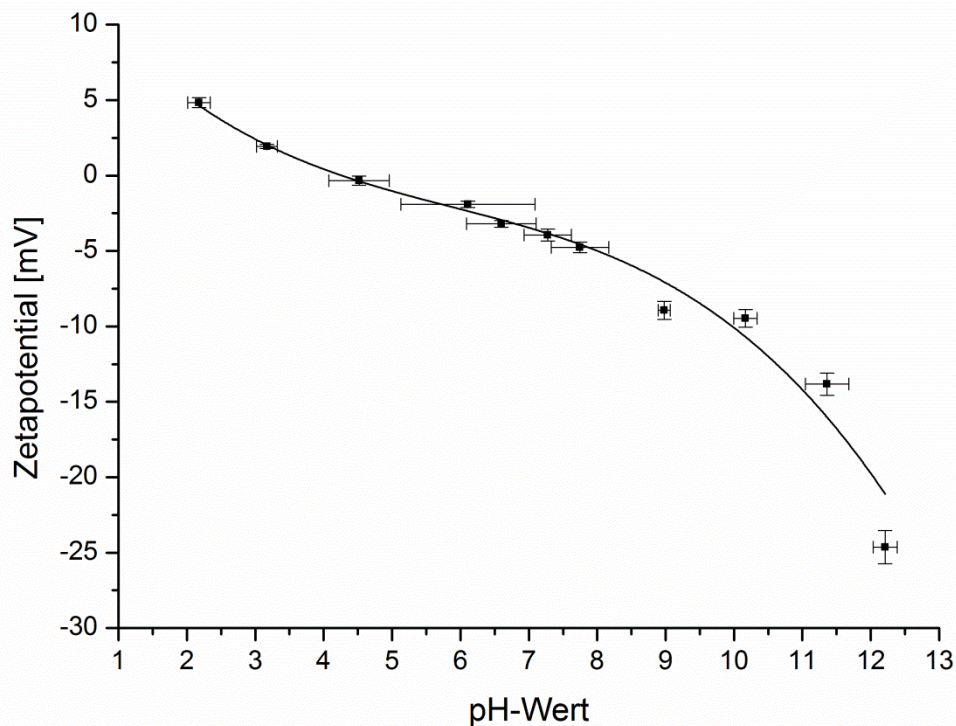


Abbildung 38: Zetapotential (Strömungspotential) von redispergiertem Roth 15A Filterpapier als Funktion des pH-Werts bei $\chi = 6,6 \text{ mS cm}^{-1}$.

4.4. Struktur der verwendeten Papiere

4.4.1. Papierdichte

Papiere aus Eukalyptussulfatzellstoff sowie Baumwollinterszellstoff wurde mit Flächengewichten von 27, 45, 76, 84 und 160 g m^{-2} hergestellt (Abschnitt 9.4.1). Das Roth 15A Filterpapier mit einem Flächengewicht von 84 g m^{-2} wurde wie erworben untersucht.

Zunächst wurde die Papierdicke bestimmt, die anschließend mit dem während der Herstellung bestimmten Flächengewicht der Papiere nach Gleichung 2 zur Berechnung der Papierdichten verwendet wurde (Tabelle 5). Zur Analyse der Retentionsexperimente soll im Folgenden mit Papierdichten statt Flächengewichten argumentiert werden, da die Papierdichte im Gegensatz zum Flächengewicht den dreidimensionalen Aufbau des Papiers widerspiegelt und so einen besseren Eindruck über die Menge an Fluid gibt, die das Papier aufnehmen kann.^[4]

In Abbildung 39 ist der Zusammenhang zwischen Flächengewicht und Papierdichte graphisch ausgewertet.

Tabelle 5: Papierdichten der verwendeten Papiersorten für alle untersuchten Flächengewichte. Als Fehler wird die Standardabweichung einer Doppelbestimmung angenommen.

Probe	ρ_m [kg m ⁻³]	Δ [kg m ⁻³]
Linters 27	440,8	1,4
Linters 45	534,0	4,9
Linters 76	548,0	2,9
Linters 84	551,4	19,7
Linters 160	579,2	9,5
Eukalyptus 27	503,0	13,0
Eukalyptus 45	516,2	2,7
Eukalyptus 76	561,6	4,5
Eukalyptus 84	557,7	3,6
Eukalyptus 160	572,6	5,6
Roth 15A	599,2	6,0

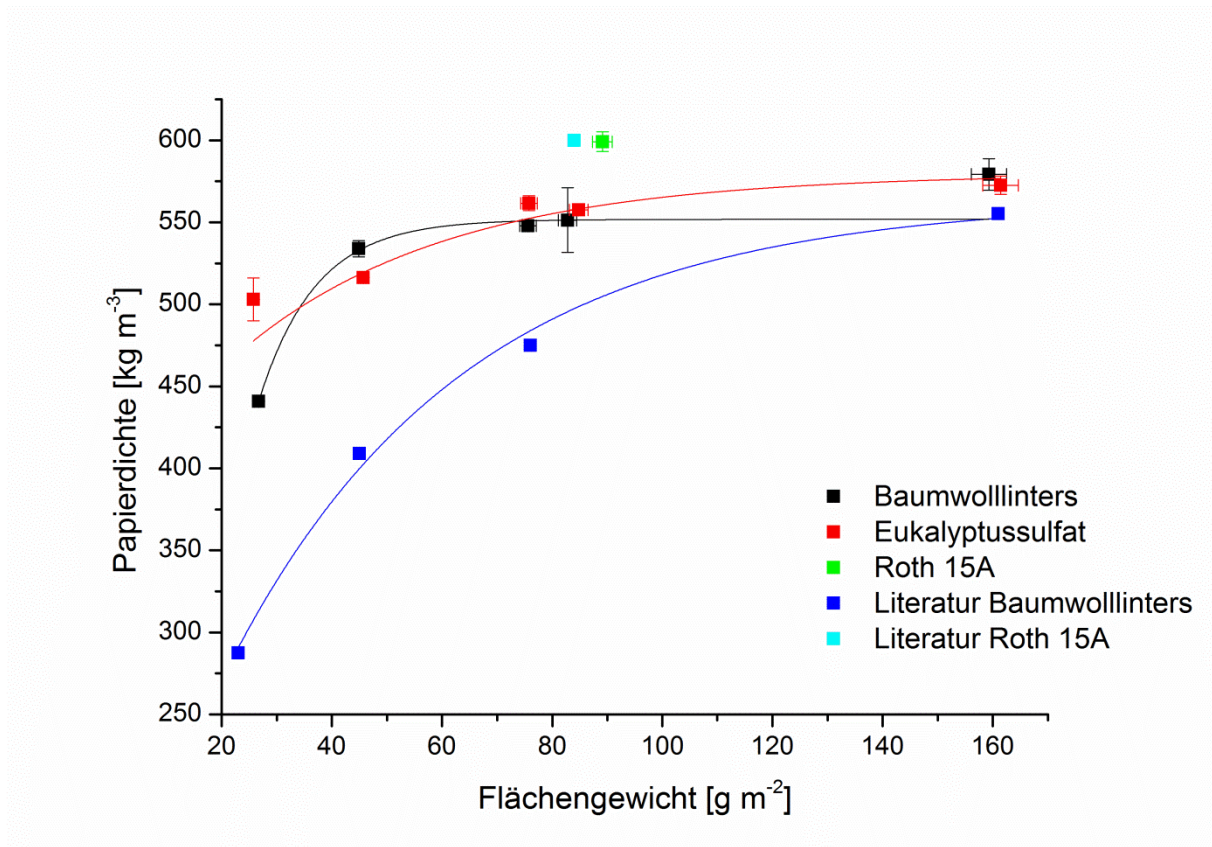


Abbildung 39: Graphische Auftragung zur Verdeutlichung des Zusammenhangs zwischen Flächengewicht und Papierdichte handgebildeter Papiere aus Baumwolllinters- und Eukalyptussulfatzellstoff sowie kommerziell erhältlichem Filterpapier Roth 15A. Literaturwerte zum Vergleich aus Böhm *et al.*^[26]

Die Papierdichte könnte als exponentiell mit dem Flächengewicht ansteigend beschrieben werden, d.h. Papiere geringerer Flächengewichte scheinen weniger dicht als Papiere mit höheren Flächengewichten. Für eine fundierte Aussage wurden allerdings zu wenige Datenpunkte in der Messreihe erhoben.

Beim Vergleich der verschiedenen Papiersorten fiel auf, dass die Länge der Fasern auf die Papierdichte nur für das geringste Flächengewicht von 27 g m⁻² einen Einfluss zu haben scheint. Die

Erwartung, dass kürzere Fasern ein dichteres Papier bilden, da Leerräume besser ausgefüllt werden könnten, wurde nur für das geringste Flächengewicht von den Ergebnissen bestätigt. Das Roth 15A Filterpapier wies bei ähnlichem Flächengewicht eine dichtere Struktur auf als die manuell hergestellten Papiere. Dies könnte in der Herstellungsweise begründet liegen (Kalandrierung, Glättung). Diese Vermutung wird auch durch den Vergleich der Messergebnisse mit den Literaturwerten^[26] unterstützt. Während die Ergebnisse für das kommerziell erworbene und daher immer gleich hergestellte Roth 15A Filterpapier sehr ähnlich waren, unterschieden sie sich bei den handgebildeten Papieren deutlich. Die Papierdichte der handgebildeten Papiere war höher als die der Literatur. Der Unterschied war umso größer, je geringer das Flächengewicht ist. Hier scheint zum Tragen zu kommen, dass die Papiere zwar unter den gleichen Bedingungen allerdings an unterschiedlichen Blattbildnern mit einer anderen Zellstoffcharge hergestellt wurden. Es wird deutlich, wie entscheidend schon geringe Unterschiede in der Herstellung sein können.

4.4.2. Quecksilberporosimetrie

In Kapitel 5 soll die Retention verschiedener Farbstoffe in einem mikrofluidischen System basierend auf Papier als Substrat untersucht werden. Der mikrofluidische Transport und daher möglicherweise auch die Retention der Farbstoffe werden vom Porenradius der Papiersubstrate beeinflusst (Abschnitt 3.1.4). Die Porosität beeinflusst die Oberfläche der Papiersubstrate, die mit dem transportierten Fluid und damit auch den Farbstoffmolekülen in Kontakt kommen könnte. Eine größere Oberfläche bietet mehr Wechselwirkungspotential und könnte folglich eine stärkere Retention bedingen.

Um in Kapitel 5 beurteilen zu können, inwiefern die Farbstoffretention von diesen Größen abhängt, wurden Porenradius und Porosität der verwendeten Papierproben in diesem Abschnitt anhand von Quecksilberporosimetriemessungen untersucht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ergebnisse der Quecksilberporosimetriemessung: mittlerer Porenradius r und Porosität P für Papiere verschiedener Flächengewichte aus Baumwollinters-, Eukalyptussulfatzellstoff sowie kommerziell erhältlichem Filterpapier Roth 15A. Alle Ergebnisse für einen Porenbereich von $d = 0\text{--}35\ \mu\text{m}$.

Probe	r [μm]	$\sigma(r)$ [μm]	P [%]	$\sigma(P)$ [%]
Linters $27\ \text{g m}^{-2}$	7,29	0,00	30,4	0,5
Linters $45\ \text{g m}^{-2}$	5,15	0,10	30,8	0,7
Linters $76\ \text{g m}^{-2}$	4,83	0,02	37,5	1,8
Linters $84\ \text{g m}^{-2}$	4,77	0,30	27,8	2,1
Linters $160\ \text{g m}^{-2}$	3,30	0,00	32,3	1,1
Eukalyptus $27\ \text{g m}^{-2}$	5,89	0,06	41,0	7,0
Eukalyptus $45\ \text{g m}^{-2}$	5,32	0,04	44,6	6,9
Eukalyptus $76\ \text{g m}^{-2}$	4,40	0,08	47,1	4,3
Eukalyptus $84\ \text{g m}^{-2}$	4,44	0,03	48,5	3,0
Eukalyptus $160\ \text{g m}^{-2}$	3,78	0,16	46,0	0,1
Roth 15A Filterpapier	2,69	0,13	28,9	3,4

Mittlerer Porenradius

Die Ergebnisse der Quecksilberporosimetrie zeigten deutlich, dass der mittlere Porenradius für Baumwollinters- und Eukalyptussulfatpapiere mit steigender Papierdichte abnahm (Abbildung 40). Da ein linearer Zusammenhang im Rahmen eines gewissen Fehlers für beide Fasertypen zu beobachten war, scheint der Zusammenhang unabhängig vom Fasertyp zu sein. Dies entspricht den Erwartungen, denn eine höhere Papierdichte bedeutet mehr Fasermaterial im gleichen Volumenbereich (vgl. Abschnitt 3.1.3), was kleinere Poren zur Folge haben sollte. Demnach hatte die Papierdichte einen deutlich größeren Einfluss auf den Porenradius als die Faserart.

Im Vergleich zu Literaturwerten^[26] von Baumwollinterspapieren unterschiedlicher Papierdichten fiel auf, dass auch die in der Literatur beschriebenen Werte im Rahmen eines gewissen Fehlers einen linearen Verlauf aufweisen, der einen abnehmenden Porenradius mit zunehmender Papierdichte zeigte. Dieser stimmte allerdings nur bedingt mit den Ergebnissen der eigenen Messungen überein. Vor allem für höhere Papierdichten lagen die Porenradien unterhalb der Werte der eigenen Papiere. Dies lässt vermuten, dass die Papierherstellung einen Einfluss auf die absoluten Werte der Porenradien hat. Die in der Literatur verwendeten Papiere und eigenen Proben wurden leicht unterschiedlich hergestellt, was der Grund für die kleineren Porenradien sein könnte. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, dass die Literaturwerte^[26] und Messwerte des kommerziellen Roth 15A Filterpapiere nahezu gleich sind.

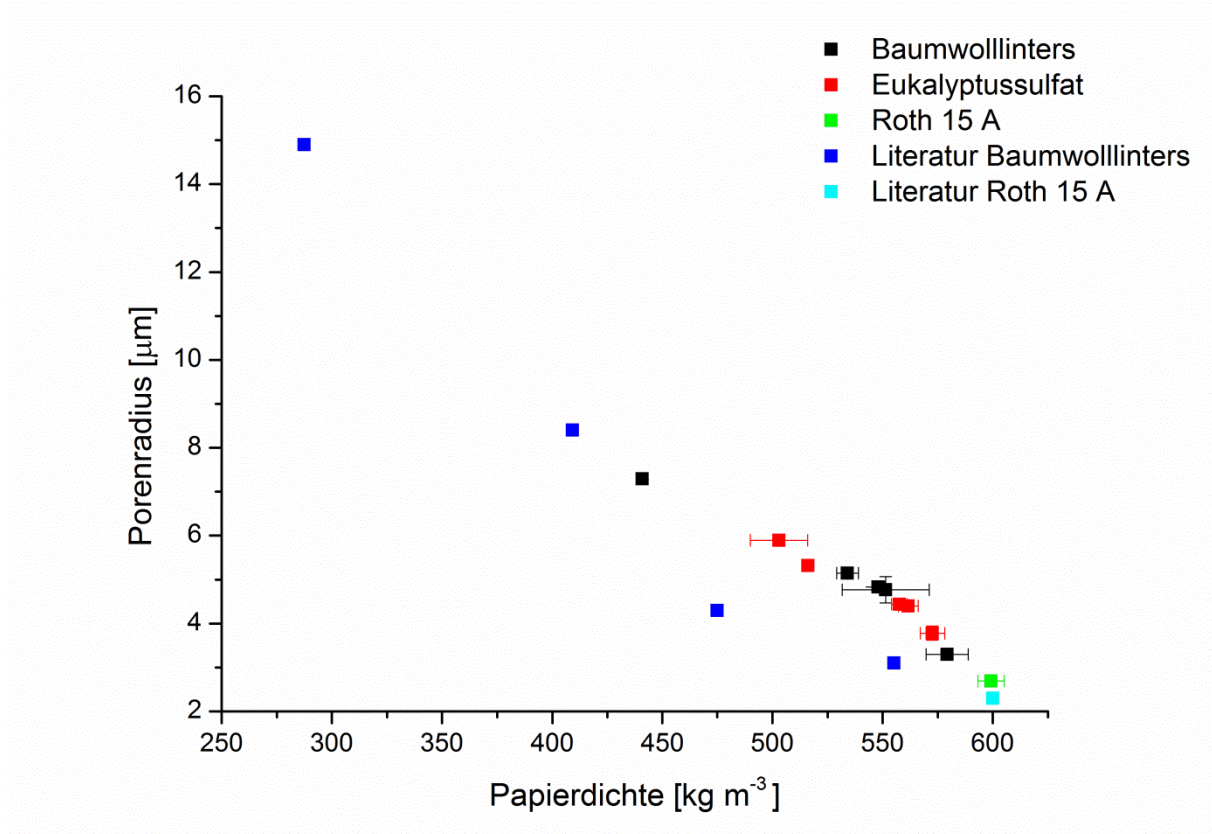


Abbildung 40: Mittlerer Porenradius als Funktion der Papierdichte für verschiedene Papiere aus Baumwollinters-, Eukalyptussulfatzellstoff sowie kommerziell erhältlichem Filterpapier Roth 15A. Alle Ergebnisse für einen Porenbereich von $d = 0\text{--}35\text{ }\mu\text{m}$. Literaturwerte zum Vergleich aus Böhm *et al.*^[26]

Porosität

Neben den Porenradien wurde auch die Porosität der Papierproben ermittelt (Abbildung 41). Im Gegensatz zu den Porenradien war hier kein eindeutiger Trend in Abhängigkeit von der Papierdichte zu beobachten. Es konnte lediglich festgestellt werden, dass im Bereich einer ähnlichen Dichte die Porosität der Eukalyptussulfatpapier durchschnittlich höher ist als die der Baumwollinterspapiere bzw. des Roth 15A Filterpapiers. Zwar wurde nach Literatur^[4] keine Korrelation der Porengröße und Porosität erwartet, dennoch wiesen Literaturwerte^[26] im Gegensatz zu den vermessenen Proben einen deutlichen Trend auf. Je geringer die Papierdichte einer Probe, desto höher war deren Porosität.

Folglich wurde befürchtet, dass die ermittelten Porositäten der Proben mit signifikanten Fehlern behaftet sind. Die Literatur macht deutlich, dass Quecksilberporosimetrie generell eine sehr fehleranfällige Methode ist. Besonders kritisch für die Ermittlung des Porenvolumens, und nach Gleichung 3 folglich auch für die Ermittlung der Porosität, sind Fehler bezüglich der Volumenmessung der bei einem bestimmten Druck einpenetrierten Quecksilbermenge. Diese liegen beispielsweise in der Ausbildung künstlicher Poren zum Beispiel zwischen Glaswand und Probe, einer unsauberen oder ungleichmäßigen Glaskapillare oder in der für die Auswertung relevanten Annahme, dass alle Poren zylindrisch aufgebaut sind, begründet. Aus diesem Blickwinkel war fraglich, ob die Standardabweichung als Fehlermaß bei einer Doppelbestimmung ausreichend ist, oder in der Realität von einem deutlich größeren Fehler ausgegangen werden muss. Folglich sind die Ergebnisse der Quecksilberporosimetrie in Bezug auf die Porosität sehr kritisch zu betrachten.

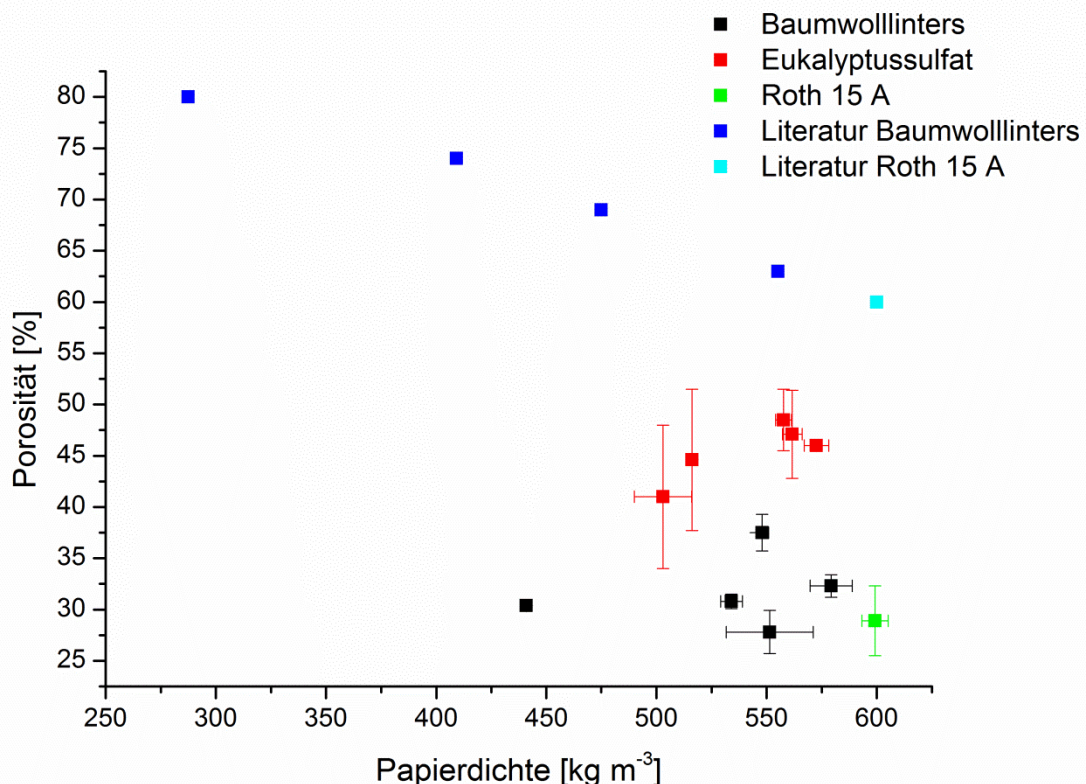


Abbildung 41: Porosität als Funktion der Papierdichte für verschiedene Papiere aus Baumwollinters-, Eukalyptussulfatzellstoff sowie kommerziell erhältlichem Filterpapier Roth 15A. Alle Ergebnisse für einen Porenbereich von $d = 0\text{--}35\text{ }\mu\text{m}$. Literaturwerte zum Vergleich aus Böhm *et al.*^[26]

4.5. Fazit

Der erste Abschnitt dieser Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung des verwendeten Substratmaterials Papier. Dazu wurden typische Kenngrößen und Eigenschaften der verwendeten Papier aus Eukalyptussulfat- und Baumwollintersfasern sowie des kommerziell erhältlichen Roth 15A Filterpapier ermittelt. Im Fokus standen Eigenschaften, die zur Begründung der Beobachtungen in den Retentionsexperimente der folgenden Ergebniskapitel relevant sein könnten.

Ergebnisse mit kleinen Fehlern und in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten wurden für die **Elementaranalyse** (Abschnitt 4.1.1) und **FTIR-Untersuchung** (Abschnitt 4.1.2) der Papierproben ermittelt. Die Ergebnisse zeigten kaum Unterschiede für die drei verwendeten Papiersorten, sodass aufgrund der fundamentalen Zusammensetzung der Papiere kein Einfluss auf die Retention der Analyten zu erwarten ist.

In Bezug auf die **Faserbeschaffenheit** wurden die Länge, Breite und Krümmung der Cellulosefasern sowie die Fibrillierung und der Feinstoffgehalt untersucht (Abschnitt 4.2). Länge^[26] und möglicherweise auch Breite und Krümmung der Cellulosefasern könnten den Fluidtransport in Papier und so indirekt die Retention von Analyten beeinflussen. Fibrillierung und Feinstoffgehalt haben nach Niskanen *et al.*^[68] sogar einen direkten Einfluss auf die Retention der Analyten. Faserkrümmung und Fibrillierung zeigten nur geringe Unterschiede für die verschiedenen Fasertypen. Daher könnten mögliche Retentionsunterschiede hiermit nicht begründet werden. Faserlänge und -breite sowie der Feinstoffgehalt zeigten die deutlichsten Unterschiede zwischen den verschiedenen Faserproben und könnten folglich einen Einfluss auf die Retention begründen. Allerdings muss festgehalten werden, dass die Unterschiede der verschiedenen Fasertypen für alle gemessenen Größen nicht sehr stark sind und daher nicht zwangsläufig zu Unterschieden in der Retention führen.

Nach Garnier *et al.*^[6] ist der Größenausschluss, abhängig von Substratporengröße und Analytgröße, ein möglicher Einfluss für die Wechselwirkung von Analyten mit Papiersubstraten. Des Weiteren beeinflussen Papierdichte^[26] und Porengröße den Fluidtransport in Papieren (Abschnitt 3.1.4) und könnten daher einen indirekten Einfluss auf die Wechselwirkung von Analyten mit dem Papiersubstrat haben. Schließlich könnte eine variierende Porosität eine zur Wechselwirkung der Analyte zur Verfügung stehende Oberfläche bedingen und damit möglicherweise auch die Analytretention. Eine Betrachtung der Dichte, Porengröße und Porosität der verwendeten Papiersubstrate unterschiedlicher Flächengewichte (27, 45, 76, 84, 160 g m⁻²) wurde daher vorgenommen. Der Zusammenhang von Flächengewicht und Dichte (Abschnitt 4.4.1) des Substratmaterials ergab einen annähernd exponentiellen Verlauf und verdeutlichte, dass ein Vergleich mit Literaturwerten nur bedingt (Roth 15A Filterpapier) möglich ist. Porengröße und Porosität der verwendeten Papiersubstrate wurden anhand von **Quecksilberporosimetrie** (Abschnitt 4.4.2) untersucht. Es war eine deutliche Abhängigkeit des Porenradiuses von der Papierdichte zu beobachten. Die Papiersorte hatte hingegen kaum Einfluss auf den Porenradius. Bei Experimenten, die die Papierdichte variieren, muss folglich mit einem durch unterschiedliche Porenradien begründeten Einfluss auf die Retention gerechnet werden. Die ermittelten Werte der Porosität waren vermutlich fehlerbehaftet, da sie weder in Trend noch Größenordnung mit Literaturwerten übereinstimmen. Dies wurde auf die Methodik der Quecksilberporosimetrie zurückgeführt. Bei dieser fehleranfälligen Methode könnte eine fehlerbehaftete Volumenmessung begründet durch die Ausbildung künstlicher Poren oder vorausgesetzte Näherungen das Ergebnis verfälscht haben. Daher können die ermittelten Werte der Porosität zur Begründung der Ergebnisse der Retentionsexperimente in den folgenden Ergebniskapiteln nur begrenzt herangezogen werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Größe einen Einfluss auf die Retention der Analyte im Substratmaterial hat, allerdings konnte dies aufgrund der ungenauen Messungen nicht diskutiert werden.

Garnier *et al.*^[6] beschreiben die Adsorption und vor allem deren Spezialfall den Ionenaustausch als relevante Parameter bei der Wechselwirkung von Analyten in Papier (Abschnitt 3.2.1). Folglich wurde die Ladung der Cellulosefasern der verwendeten Fasersorten in Abhängigkeit des pH-Werts anhand von **Zetapotentialmessungen** (Abschnitt 4.3) untersucht. Für Eukalyptussulfatfasern und Baumwollintersfasern wurde ein äquivalenter Verlauf in einem ähnlichen Wertebereich festgestellt. Die Ladung der Faserstoffe war über den untersuchten pH-Bereich (pH 2–12) negativ und nahm nach einem Plateau zwischen pH 5–11 bei pH 12 noch einmal deutlich ab, was mit dem Deprotonierungsverhalten der Carboxyl- bzw. Hydroxylgruppen begründet werden konnte. Redispergierte Roth 15A Filterpapierfasern hingegen waren bis ca. pH 4 positiv geladen, was dem Vorhandensein von positiv geladenen Additiven im Papier zugeschrieben wurde. Die Messergebnisse des redispergierten Roth 15A Filterpapierfaserstoffs wiesen eine kontinuierliche Abnahme des Potentials über den gemessenen Bereich auf, bis bei pH 12 ebenfalls ein deutlicher Sprung beobachtet werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Ladung(sstärk)en einen Einfluss auf die Wechselwirkung von Analyten mit dem Papiersubstrat haben. Daher erscheint besonders die Kenntnis über mögliche Additive, welche im Herstellungsprozess teilweise in die Papiere eingebracht werden, als wichtig.

5. Analyse des Retentionsverhaltens von Modellfarbstoffen in Papier

Für ein besseres Verständnis der Retention von Modellanalyten in Papier wurden in diesem Abschnitt die komplexen Vorgänge, die beim kapillarkraftgetriebenen Transport von Farbstoff bzw. Farbstoffmischungen in Cellulosefasernetzwerken ablaufen, genauer untersucht. Zwar erschwerte die Tatsache, dass Papier ein heterogenes und komplexes System^[80] ist, die Auswertung, dennoch lieferten die ermittelten Daten gute Ansatzpunkte zur Beschreibung der Retention von Modellmolekülen in Papiersubstraten. Theoretische Grundlage für die hier diskutierten Phänomene bieten neben dem Aufbau der Cellulosefasern (Abschnitt 3.1.1) die Betrachtung zum Thema Chromatographie (Abschnitt 3.2.1) sowie die Wechselwirkung von Farbstoffen mit Cellulosefasern (Abschnitt 3.1.3 und Abschnitt 3.2.2).

Zunächst wurde die chemische Struktur der verwendeten Modellfarbstoffe Tartrazin und Methylenblau in Bezug auf ihre pH-wertabhängige Änderung genauer beschrieben. Anschließend wurde die Retention beider Modellmoleküle in Anhängigkeit von Änderungen der fluiden und soliden Phase untersucht. Teile der in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse wurden bereits in der Bachelorarbeit von Frau Michelle Lisa Stegmann^[142] und bei Wendenburg *et al.*^[132] veröffentlicht.

5.1. Chemische Struktur der Farbstoffe in Abhängigkeit des pH-Werts

5.1.1. Negativ geladener Modellfarbstoff: Tartrazin

Da für den negativ geladenen Modellfarbstoff Tartrazin die Literatur bekannten Informationen^[101-102] zur chemischen Struktur in Abhängigkeit des pH-Werts kein vollständiges Bild ergeben, sollte dieses durch eine Säure-Base-Titration vervollständigt werden.

Konkret wurden die pK_a -Werte von Tartrazin in einer Zellstoffsuspension ermittelt. Dies sollte die Umgebung des Farbstoffs im feuchten Papierkanal imitieren. Dazu wurde eine Tartrazin-Zellstoffsuspension ($c = 20 \text{ mg mL}^{-1}$) mit Natronlauge von pH 1,5 bis pH 12,3 titriert (Details der Durchführung in Abschnitt 9.6.1). Die ermittelte Titrationskurve (Abbildung 42) ließ auf zwei pK_a -Werte bei $1,92 \pm 0,01$ und $9,18 \pm 0,16$ schließen.

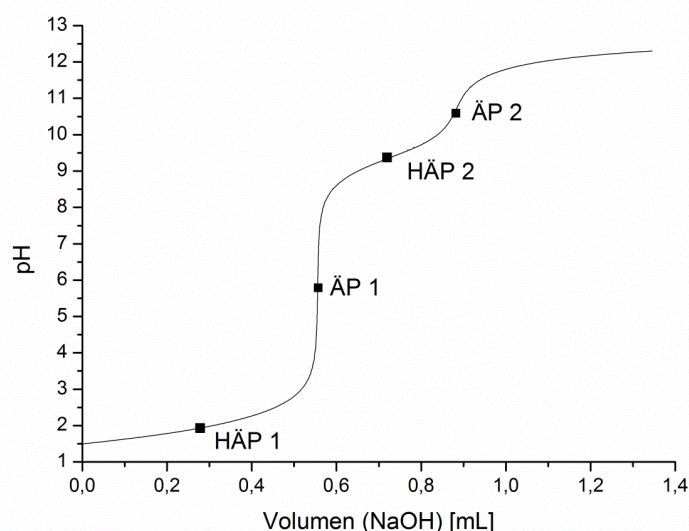


Abbildung 42: Titrationskurve einer Tartrazin-Zellstoffsuspension ($c = 20 \text{ mg mL}^{-1}$). pH-Wert als Funktion des Volumens zutitrierter einmolarer Natronlauge. HÄP–Halbäquivalenzpunkt; ÄP–Äquivalentpunkt.^[132]

Die Ergebnisse legen Strukturänderungen in Abhängigkeit des pH-Werts, wie in Abbildung 43 dargestellt, nahe.

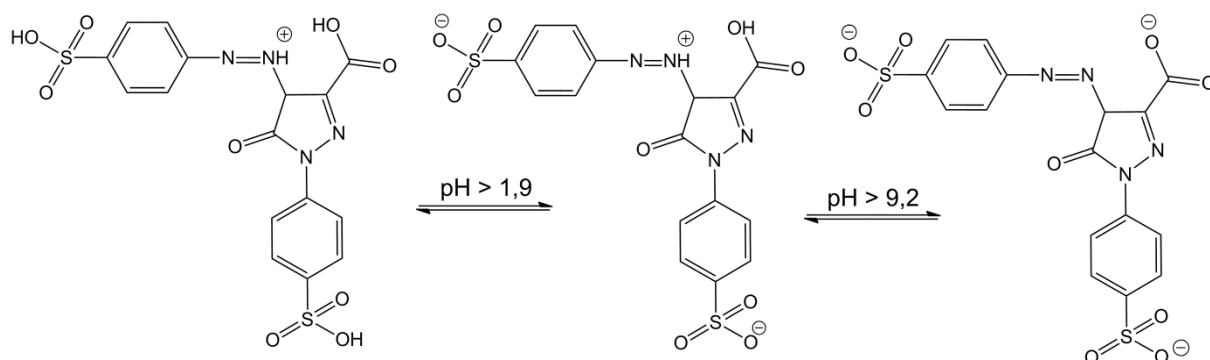


Abbildung 43: Schematische Darstellung der chemischen Struktur des Modellfarbstoffs Tartrazin in Abhängigkeit des pH-Werts.^[132]

Wie Gomez *et al.*^[102] beschrieben, weisen Sulfonsäuregruppen einen pK_a -Wert von 2 auf. Eine Deprotonierung der Sulfonsäuregruppen des Tartrazins korreliert folglich mit dem in der Säure-Base-Titration ermittelten pK_a -Wert bei $1,92 \pm 0,01$. Gomez *et al.*^[102] beschrieben weiterhin eine Deprotonierung der Essigsäuregruppe bei pK_a 5 und der Azogruppe bei pK_a 10,86. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden. Stattdessen wurde eine Deprotonierung bei einem pK_a -Wert von $9,18 \pm 0,16$ beobachtet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Azogruppe und die räumlich benachbarte Carboxylgruppe in diesem pH-Wertbereich gleichzeitig deprotonieren. Dies führt daher lediglich zu einem weiteren pK_a -Wert bei $9,18 \pm 0,16$.

Wird die Nettoladung des Tartrazinmoleküls in Abhängigkeit der pH-kontrollierten beschriebenen Strukturänderungen betrachtet, ergibt sich um pH 2 eine Ladungsänderung von einfach positiv geladen auf einfach negativ geladen. Um pH 9 wird eine Änderung von einfach negativ geladen auf dreifach negativ geladen erwartet. Folglich ist der Farbstoff Tartrazin über den größten Teil der untersuchten pH-Spanne negativ geladen und diente in dieser Arbeit als "negativer Modellfarbstoff".

Die Ergebnisse der Säure-Base-Titration wurden anhand von pH-wertabhängigen UV-VIS-Messungen überprüft. Dazu wurden Tartrazinlösungen in Wasser ($c = 0,0187 \text{ mmol L}^{-1}$) mit verschiedenen pH-Werten im Bereich pH 1–13 untersucht. Wie zu erwarten war, konnte ein Shift des Absorptionsmaximums bei etwa pH 2 und pH 9 beobachtet werden (Abbildung 44 links). Wie Abbildung 44 rechts verdeutlicht, shiftete die Wellenlänge des Absorptionsmaximums leicht zwischen pH 1 und pH 2 (430 nm nach 427 nm) und deutlich stärker ab pH 10 (427 nm nach 398 nm). Dies entspricht den Erwartungen, denn zwischen pH 1 und pH 2 wird die elektronische Struktur des Fluorophors durch die Deprotonierung der Sulfonsäuregruppen nur wenig verändert. Der Shift der Wellenlänge zwischen pH 9 und pH 11 fiel deutlich stärker aus, da hier durch die Deprotonierung der Essigsäure- und Azogruppe die elektronische Struktur direkt am Fluorophor geändert wird. Die Ergebnisse der pH-wertabhängigen UV-VIS-Messungen bestätigten folglich die Ergebnisse der Säure-Base-Titration.

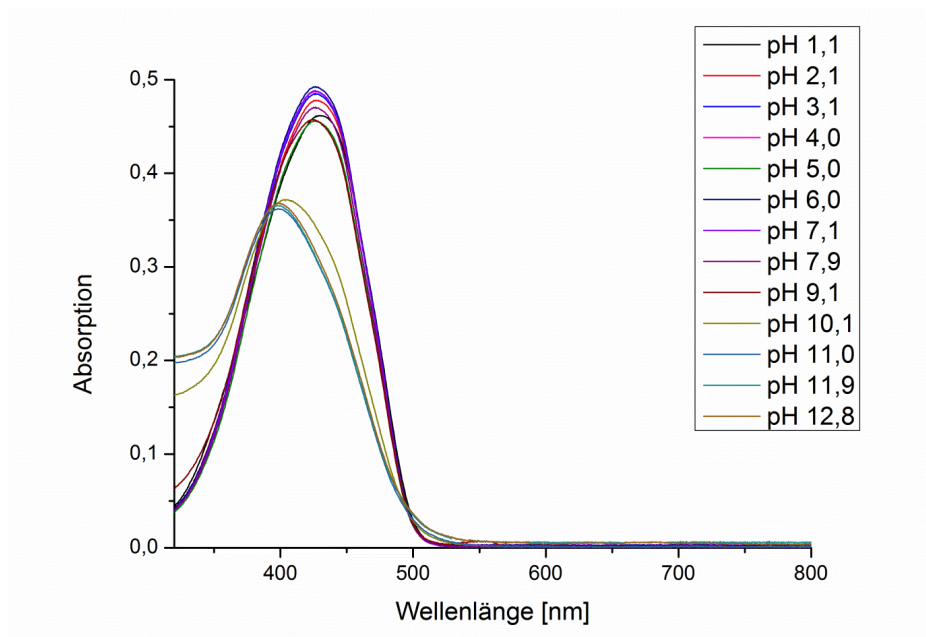


Abbildung 44: UV-VIS-Absorptionsspektren einer Tartrazinlösung ($c = 0,0187 \text{ mmol L}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten.^[132]

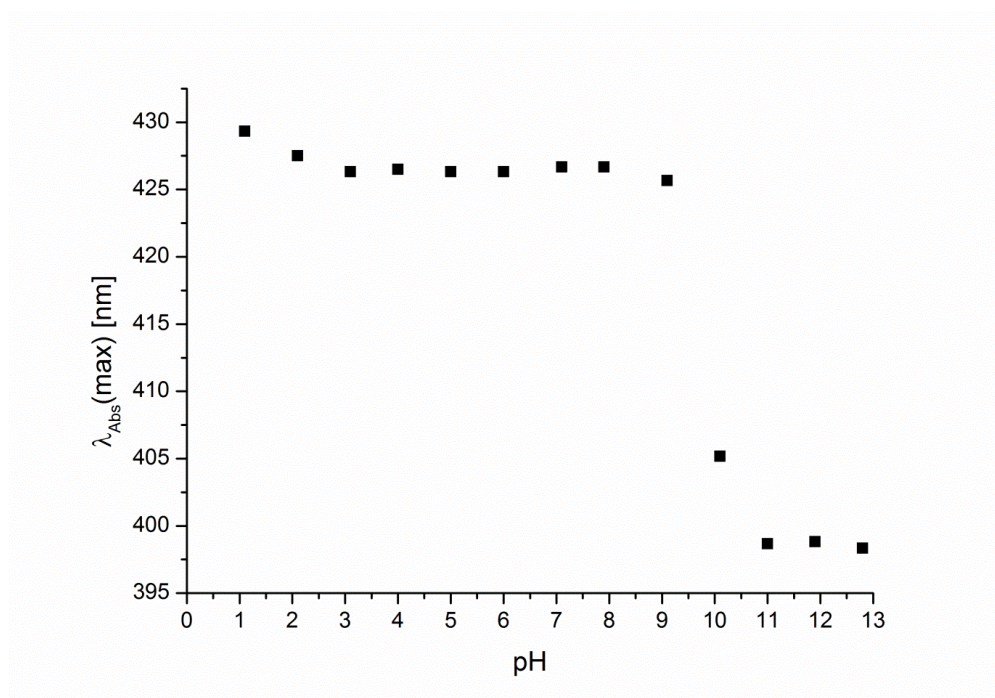


Abbildung 45: Wellenlänge am Absorptionsmaximum einer Tartrazinlösung ($c = 0,0187 \text{ mmol L}^{-1}$) als Funktion des pH-Werts.

5.1.2. Positiv geladener Modellfarbstoff: Methylenblau

Auch die weitaus umfangreicheren aus der Literatur bekannten^[100, 108, 143] Informationen zum positiv geladenen Modellfarbstoff Methylenblau wurden durch die Daten einer Säure-Base-Titration und einer pH-abhängigen UV-VIS-Messung ergänzt.

Für die Überprüfung der pK_a -Werte mittels Säure-Base-Titration wurde eine Methylenblau-Zellstoffsuspension ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) mit Natronlauge von pH 1,5 bis pH 12,3 titriert (Details der

Durchführung in Abschnitt 9.6.1). Die ermittelte Titrationskurve (Abbildung 46) ließ auf einen pK_a -Wert bei $1,81 \pm 0,01$ schließen. Dies stimmt mit den Literatur bekannten Daten überein.^[100, 108, 143]

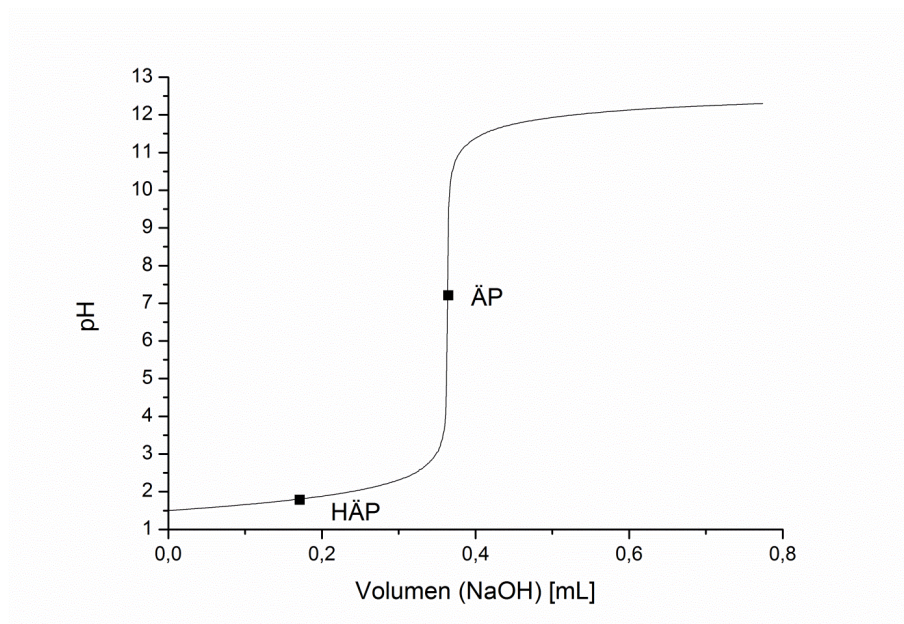


Abbildung 46: Titrationskurve einer Methylenblau-Zellstoffsuspension ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$). pH-Wert als Funktion des Volumens zutitrierter einmolarer Natronlauge. HÄP–Halbäquivalenzpunkt; ÄP–Äquivalentpunkt.^[132]

Eine Strukturänderungen in Abhängigkeit des pH-Werts, wie in Abbildung 47 darstellt, ist anzunehmen.

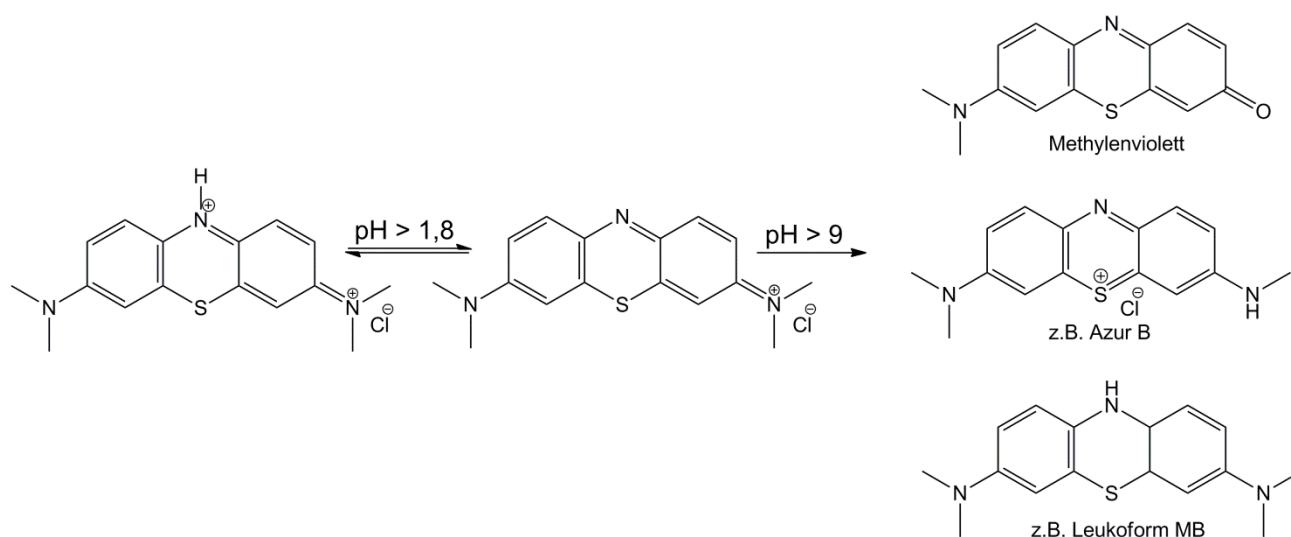


Abbildung 47: Schematische Darstellung der chemischen Struktur des Modellfarbstoffs Methylenblau in Abhängigkeit des pH-Werts.^[132]

Die Ergebnisse der Titration ($pK_a = 1,81 \pm 0,01$) lassen darauf schließen, dass im stark Säuren eine pH-basierte Protonierung des Thiazin-Stickstoffatoms stattfindet. Dies stimmt mit Literaturdaten überein.^[143d] Für basische pH-Werte ($pH > 9$) wurde eine zeitabhängige Entfärbung der Lösung beobachtet. Nach Katafias *et al.*^[143a] und Tzung *et al.*^[143b] liegt dies eine stufenweise N-Demethylierung sowie Deaminierung des Methylenblaus zu verschiedenen Farbstoffen (z.B. Azur B,

A, C oder Methylenviolett) begründet. Die Umsetzungsmechanismen^[143a] sind noch nicht ausreichend untersucht, aber vermutlich wurde hauptsächlich schwer wasserlösliches Methylenviolett gebildet.^[144] Dieses fiel aus der Lösung aus und führte so zur Entfärbung. Auch die Bildung von farblosen Leukoformen ist denkbar.^[143b]

Für die Nettoladung des Methylenblaumoleküls ergibt sich folglich eine einfach positive Ladung über den gesamten, untersuchten pH-Bereich. Lediglich bei pH 1 lag eine zweifach positive Ladung vor. Daher wurde Methylenblau in dieser Arbeit als "positiver Modellfarbstoff" verwendet. Der pH-Bereich ≥ 9 wurde nicht untersucht, da hier von einer Zersetzung des Farbstoffs ausgegangen werden muss.

Auch für Methylenblau wurden die Ergebnisse der Säure-Base-Titration anhand von pH-wertabhängigen UV-VIS-Messungen überprüft. Neben Rückschlüssen auf die Lokalisierung der Protonierung/Deprotonierung konnte hier auch die Zersetzung des Farbstoffes durch oxidative Demethylierung/Deaminierung und Reduktion^[143a] beobachtet werden, durch zeitlich versetzte Messungen sogar in der chronologischen Entwicklung.

Eine Methylenblaulösung in Wasser ($c = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) wurde bei verschiedenen pH-Werten im Bereich pH 1–13 untersucht. Die Messungen wurden nach zwei Wochen wiederholt. Die entsprechenden UV-VIS-Spektren sind in Abbildung 49 dargestellt. Das Hauptmaximum der Absorption lag bei allen pH-Werten bei 665 nm mit einer Schulter bei 617 nm. Bei pH 1 ist ein zusätzlicher Peak bei 743 nm zu beobachten, was auf eine Deprotonierung zwischen pH 1 und pH 2 schließen lässt. Dies bestätigt den mittels Säure-Base-Titration bestimmten pK_a -Wert von $1,81 \pm 0,01$. Die Absorption des Hauptmaximums reduzierte sich mit steigendem pH-Wert. Bei pH 13 war dies bereits für die frisch angesetzte Methylenblaulösung zu beobachten. Nach zwei Wochen war dieser Trend für pH-Werte ab pH 6 schwach und ab pH 10 deutlich zu erkennen (Abbildung 50). Lösungen bei pH 12 und pH 13 waren nach zwei Wochen sogar vollständig entfärbt. Dies ließ auf einen pH-induzierten Abbau des Farbstoffmoleküls schließen.

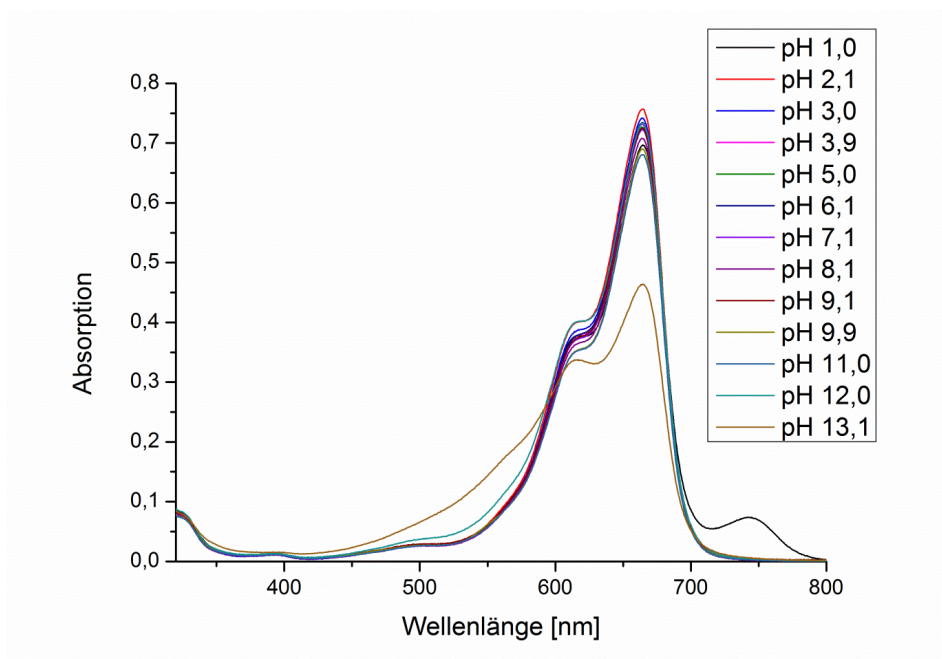


Abbildung 48: UV-VIS-Absorptionsspektren frisch angesetzter Methylenblaulösungen ($c = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten.

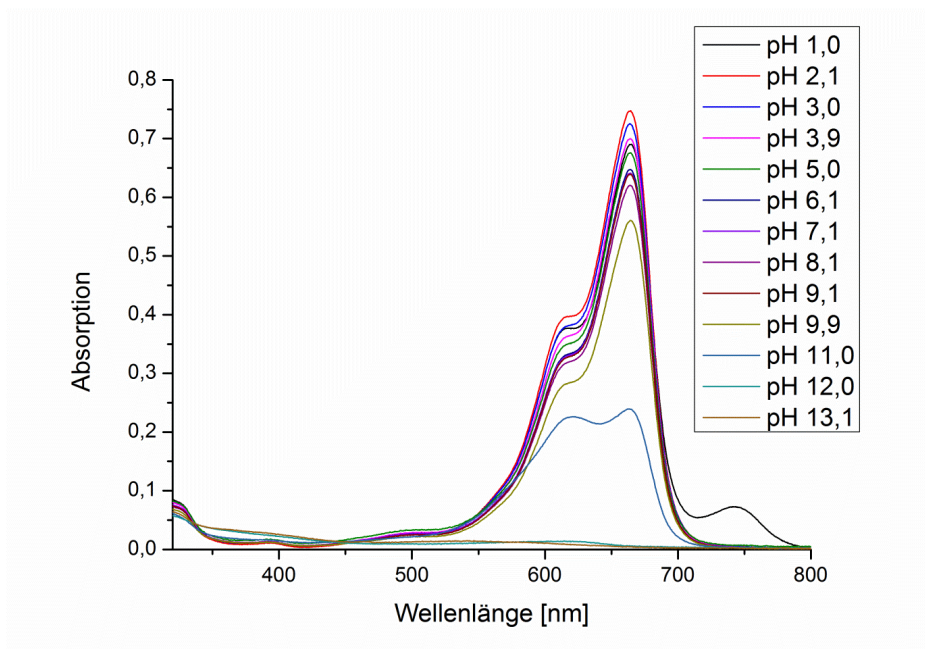


Abbildung 49: Rechts: UV-VIS-Absorptionsspektren von Methylenblaulösungen ($c = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten nach zwei Wochen.^[132]

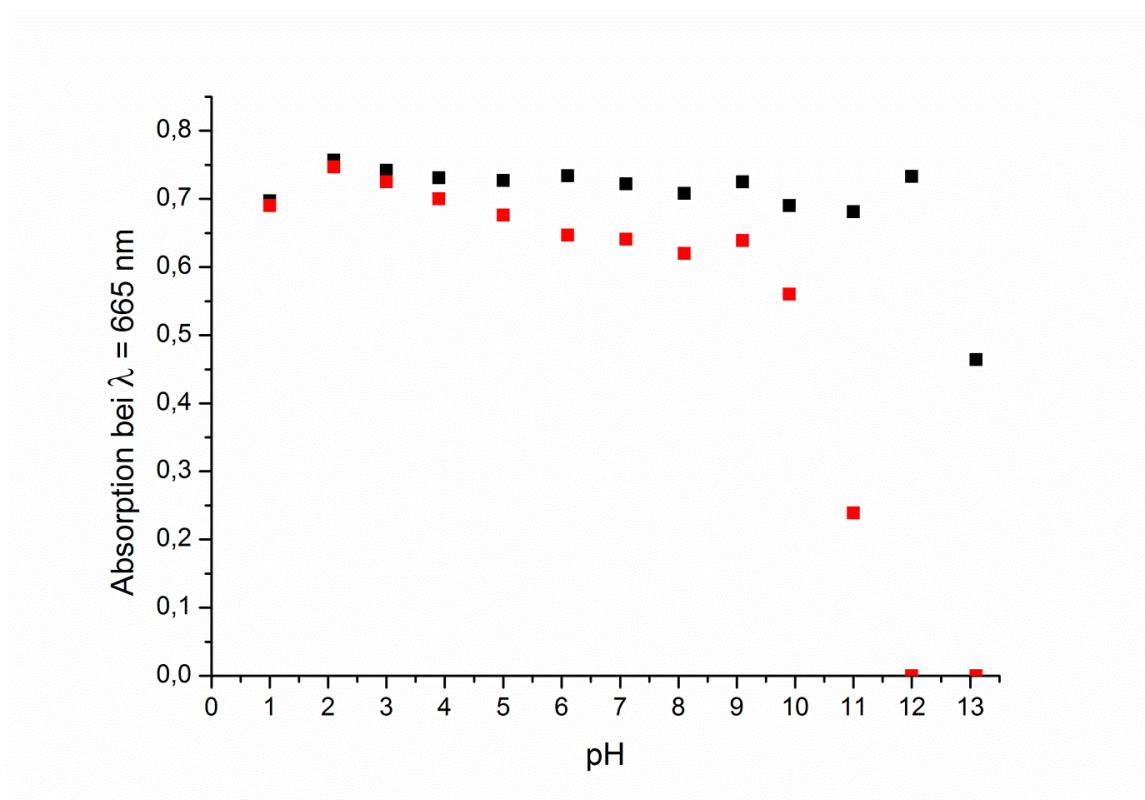


Abbildung 50: Absorption einer Methylenblaulösung ($c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) bei 665 nm als Funktion des pH-Wertes für eine frisch angesetzte Lösung (schwarz) und dieselbe Lösung nach zwei Wochen (rot).

5.2. Retentionsverhalten in Abhängigkeit von der fluiden Phase

Der Einfluss der fluiden Phase als Fokus für Retentionsexperimente ist in Bezug auf spätere Anwendungen z.B. in *Lab-on-a-chip*-Systemen interessant, weil zu untersuchende Fluide sehr verschieden in ihrer Zusammensetzung sein können. Allgemeine Erkenntnisse über die Abhängigkeiten der Retention verschiedener Stoffe sind Grundvoraussetzung für ein tieferes Verständnis solcher Systeme in komplexen Anwendungen. In diesem Abschnitt wurde daher die Retention der Modellfarbstoffe Tartrazin und Methylenblau in Abhängigkeit von Änderungen des pH-Werts und der Leitfähigkeit der fluiden Phase sowie des Einflusses verschiedener Konzentrationen der beiden Modellmoleküle analysiert. Untersucht wurden photolithographisch mikrostrukturierte Papiere auf Basis von Eukalyptussulfatfasern mit einem Flächengewicht von 45 g m^{-1} mit der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Methodik zur Analyse der Retention in horizontalen Systemen.

5.2.1. Einfluss des pH-Werts auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau

Zunächst wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Retention der Modellfarbstoffe untersucht. Der pH-Wert hat sowohl einen Einfluss auf die Oberflächenladung von Papier (Abschnitt 4.3) als auch auf den Deprotonierungsgrad des Farbstoffs. Daher wurde ein deutlicher Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen Faser und Farbstoff bei verschiedenen pH-Werten erwartet.^[104a]

Zur Untersuchung wurde der pH-Wert des Fluidreservoirs sowie der aufzutragenden Farblösungen für Tartrazin zwischen pH 1 und pH 13 variiert. Die Retention von Methylenblau wurde zwischen pH 1 und pH 9 untersucht, da bei höheren pH-Werten mit einer signifikanten Zersetzung des Farbstoffs zu rechnen ist (Abschnitt 5.1.2). Alle anderen Parameter (Leitfähigkeit, Farbstoffkonzentration, Fasertyp und Flächengewicht) wurden konstant gehalten. Die Details zur Durchführung, sowie Graustufenscans der mikrostrukturierten Kanäle nach den Retentionsexperimenten aller pH-Werte sind in Abschnitt 9.6.2 dargestellt. Exemplarisch sind in Abbildung 51 die Graustufenscans von pH 3, 9 und 13 für Tartrazin und pH 3 für Methylenblau aufgegriffen.

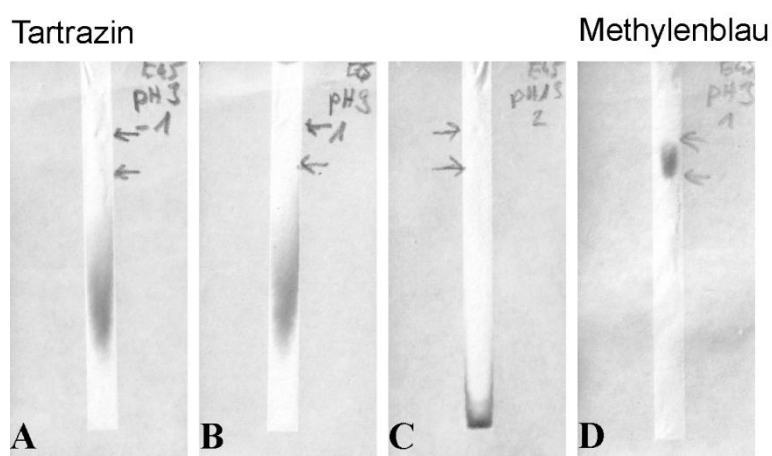


Abbildung 51: (A-C) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Tartrazinlösungen (4 mmol L^{-1} , 25 mS cm^{-1}) bei pH 3, 9, 13 (von links nach rechts). (D) Exemplarischer Graustufenscan des Retentionsexperiments für Methylenblaulösung ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, 25 mS cm^{-1}) bei pH 3.

Analyse des Retentionsfaktors (R_f) von Tartrazin und Methylenblau

Die ermittelten R_f -Werte für Tartrazin und Methylenblau sind vergleichend für beide Farbstoffe in Abbildung 52 dargestellt. Im Vergleich der beiden Farbstoffe fiel sofort auf, dass der positiv geladene Farbstoff Methylenblau eine deutlich stärkere Retention aufweist als der negativ geladene Farbstoff Tartrazin. Im Folgenden wird zunächst auf das Verhalten von Tartrazin und anschließend auf Methylenblau eingegangen.

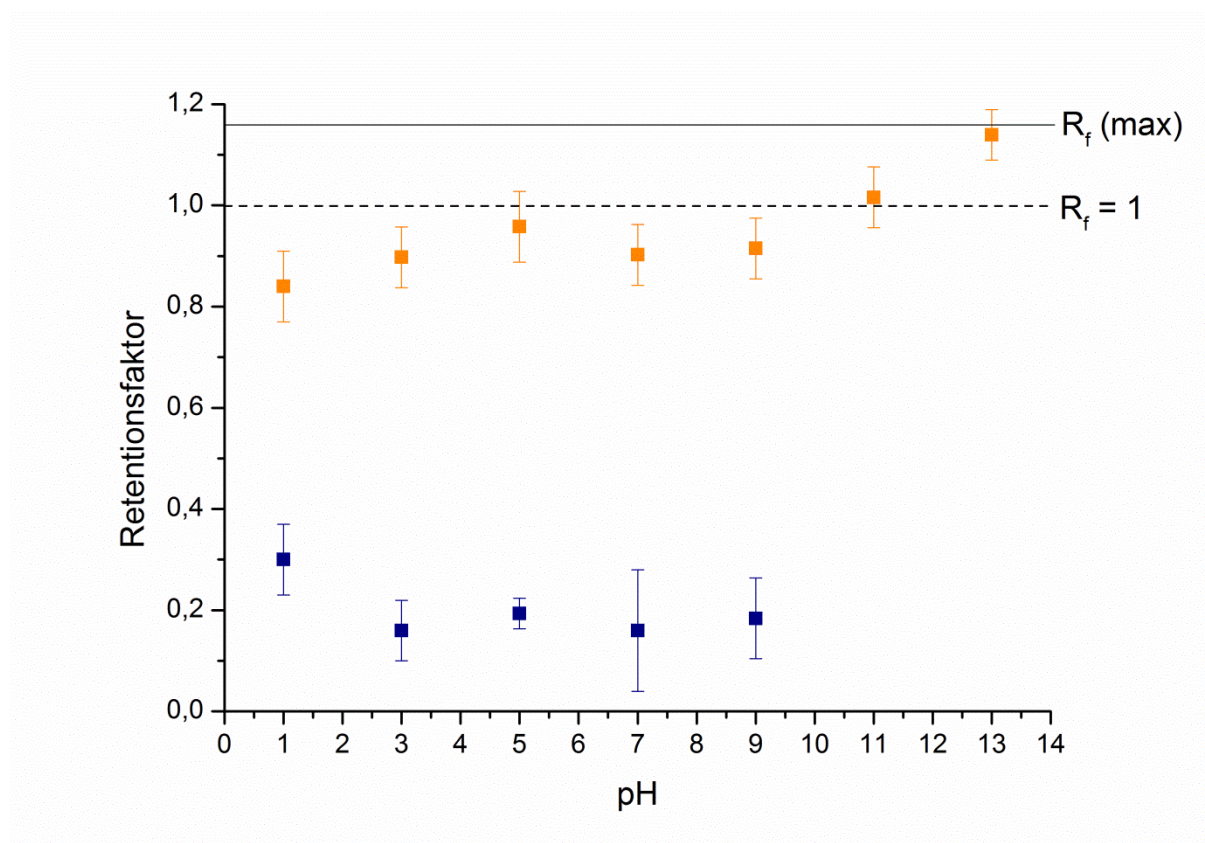


Abbildung 52: Retentionsfaktor als Funktion des pH-Wertes für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L⁻¹, pH 1-13, $\chi = 25$ mS cm⁻¹; Methylenblaulösung: 0,6 mmol L⁻¹, pH 1-9, $\chi = 25$ mS cm⁻¹; Laufmittel: deion. H₂O, pH 1-13, $\chi = 25$ mS cm⁻¹; Papiersubstrat: 45 g m⁻² Eukalyptussulfatzellstoff. Die schwarze Linie symbolisiert den rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor. Die gestrichelte Linie markiert den üblicherweise maximalen Retentionsfaktor bei 1.^[132]

Bei einer detaillierteren Betrachtung des Verlaufs der R_f -Werte für Tartrazin in Abhängigkeit des pH-Werts fiel auf, dass die Werte im Rahmen der Fehler für pH 1 bis 9 konstant blieben. Für höhere pH-Werte war ein deutlicher Anstieg des R_f -Werts zu beobachten, was auf eine Verringerung der Retention schließen lässt. Die Theorie von Bird *et al.*^[105], wonach saure Farbstoffe bei der Färbung von Cellulosefasern vor allem Van-der-Waals getrieben anbinden, konnte durch diese Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Vielmehr lässt die pH-Wertabhängigkeit sowie die Beobachtung, dass der positiv geladene Farbstoff Methylenblau deutlich stärker retentiert wurde als das negativ geladene Tartrazin, einen Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen vermuten. Aussagen bezogen auf die elektrostatischen Wechselwirkungen von Farbstoff und Faser bei pH 1 gestalten sich schwierig. Zwar ist bekannt, dass Tartrazin bei pH 1 eine positive Nettoladung aufweist, gerätebedingt war eine Zetapotentialmessung der Faserladung bei pH 1 allerdings nicht möglich. Der relativ hohe R_f -Wert legte eher ein leicht positives Zetapotential nahe, denn in diesem Fall würden gleichnamige

Ladungen eine verringerte Retention erklären. Für pH 3–9 wurde aufgrund der gleichnamigen Ladung von Farbstoff und Zellstoff eine geringe Retention ($R_f \sim 0,9$) erwartet, was auch beobachtet wurde. Der leichte Anstieg der Zellstoffladung in diesem Bereich (-8 bis -20 mS cm^{-1} ; Abschnitt 4.3) schien aufgrund der gleichnamigen Ladungen keinen signifikanten Einfluss auf die Retention zu haben. Für stark basische Lösungen (pH 10, 13) nahm die Ladungsdichte an Zellstoff ($< -27 \text{ mV}$) und Farbstoffmolekülen (dreifach negativ geladen) deutlich zu. Es wurden R_f -Werte größer 1, bis hin zum rechnerisch maximal möglichen R_f -Wert ($R_f(\text{max})$) beobachtet. Üblicherweise ist der maximal mögliche R_f -Wert erreicht, wenn Fluidfront und Farbstofffront die gleiche Strecke zurücklegen. Dann ergibt sich nach Gleichung 10 ein maximaler R_f -Wert von 1. Da im beschriebenen Versuchsaufbau (Abschnitt 3.3.1) der Farbstoffspot allerdings 0,5 cm hinter der Fluidfront aufgetragen wird, kann hier die Farbstofffront maximal sogar die Fluidfront erreichen. In diesem Fall legt die Farbstofffront eine Strecke von 0,5 cm mehr als die Fluidfront zurück, was bei einer von der Fluidfront zurückgelegten Strecke von 3,5 cm zu einem nach Gleichung 10 rechnerisch maximal möglichen R_f -Wert von 1,14 führt (Abbildung 53). Anschaulich würde das bedeuten, dass sich die Farbstoffmoleküle im gleichen mikrofluidischen Fluss schneller als die Wassermoleküle fortbewegen. Da dies jedoch physikalisch nicht sinnvoll erschien, musste nach einer Erklärung für diese Beobachtung gesucht werden.

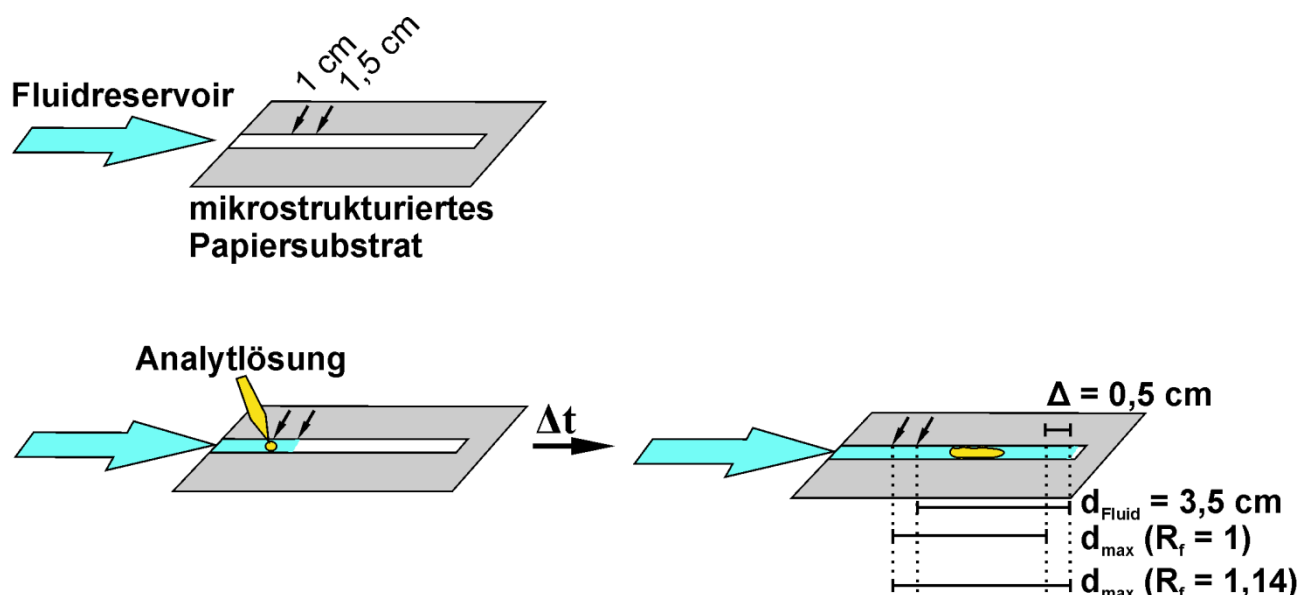


Abbildung 53: Schematische Darstellung des Verlaufs eines Retentionsexperiments. Graphisch verdeutlicht werden die von der Fluidfront zurückgelegte Strecke d_{Fluid} , sowie die maximal von der Farbstofffront zurückgelegte Strecke d_{max} , die in einen Retentionsfaktor von 1 bzw. im rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor $R_f(\text{max})$ von 1,14 resultiert.

Ein möglicher Erklärungsansatz betrachtete die Quellung der Cellulosefasern bei Kontakt mit Wasser. Verschiedene Theorien untersuchen dieses physikochemische Phänomen.^[66] Allen Theorien gemeinsam ist die Beschreibung einer Wasserschicht, bestehend aus Wassermolekülen, die über Wasserstoffbrückenbindungen direkt oder mittelbar an die freien Hydroxylgruppen der für das Wasser zugänglichen Bereiche der Cellulose gebunden sind. Diese Schicht, häufig als "gebundenes Wasser" bezeichnet, weist einige besondere Eigenschaften auf. Dabei ist die Unzugänglichkeit für gelöste Stoffe in dieser Betrachtung die Entscheidende.^[70] Die Schichtdicke des für gelöste Stoffe unzugänglichen Bereichs und damit verbunden, die Menge des so "gebundenen Wassers" hängt von verschiedenen Faktoren, wie dem Herstellungsprozess, dem Porenvolumen, der Faserstruktur oder auch dem Durchmesser und der chemischen Natur des gelösten Stoffes ab.^[66] Normiert quantifiziert

wird die Menge des "gebundenen Wassers" mit Hilfe des Faserfeuchtigkeitssättigungspunkts (FSP), (Gleichung 1 in Abschnitt 3.1.1). Typische Literatur bekannte Werte reichen von $0,12 \text{ g g}^{-1[70]}$ als Durchschnittswert für Baumwolllinters bis zu $1,41 \text{ g g}^{-1[66]}$ für Baumwolllinters gequollen in 12 molarer Natronlauge (Literaturdaten für Eukalyptussulfatfasern sind nicht bekannt).

Konkret wurde bei pH 13 ein R_F -Wert von 1,14 bestimmt. Das bedeutet, dass die Farbstofffront über eine von der Wasserfront zurückgelegte Strecke von $a = 3,5 \text{ cm}$ diese nahezu einholte, obwohl zu Beginn des Experiments ein Abstand von $\Delta x = 0,5 \text{ cm}$ zwischen beiden Fronten lag (Abbildung 54). Es wird davon ausgegangen werden, dass die Farbstoffmoleküle kapillarkraftgetriebenen genauso schnell transportiert werden wie die Wassermoleküle. Folglich kann diese Beobachtung nur unter der Annahme erklärt werden, dass den Farbstoffmolekülen ein kleineres Volumen zugänglich ist als den Wassermolekülen. Es wird angenommen, dass es sich bei dem für die Farbstoffmoleküle "ausgeschlossene Volumen" um "gebundenes" Wasser handelt. Anschaulich beschrieben wandert folglich Wasser kapillarkraftgetrieben durch den mikrostrukturierten Papierkanal. Die trockenen Fasern quellen und nehmen dabei Wassermoleküle auf. Die Farbstoffmoleküle wandern ebenfalls kapillarkraftgetrieben durch die wassergefüllten Poren der gequollenen Bereiche. Dabei erreichen sie die Bereiche des "gebundenen Wassers" nicht, was ihr tatsächliches Bewegungsvolumen im Vergleich zum für die Wassermoleküle zugänglichen Bereich einschränkt. Folglich hat dies bei gleicher Fließgeschwindigkeit für Wasser- und Farbstoffmoleküle eine scheinbare Beschleunigung der Farbstoffmoleküle zur Folge.

Trifft diese Theorie zu, sollte der berechnete FSP Literaturwerten entsprechen. Nach Gleichung 1 wurde also zunächst die Masse des "gebundenen" Wassers m (Wasser) sowie das Trockengewicht der gequollenen Fasern m (Faser, trocken) bestimmt. a' entspricht der Differenz der Strecke zwischen Farbfront und Fluidfront bei Farbstoffauftrag (Δx) und der Strecke zwischen Farbfront und Fluidfront am Ende des Experiments ($\Delta x'$) (Gleichung 17). Da bei pH 13 die Farbstofffront die Fluidfront nahezu vollständig einholte, ist Δx in diesem Fall $\sim 0,5 \text{ cm}$.

$$a' = \Delta x - \Delta x' \quad (17)$$

Nach Gleichung 18 ergab sich mit den Kanalabmessungen ($b = 0,4 \text{ cm}$ und $c = 0,09 \text{ cm}$) sowie der Porosität des Papiersubstrats P (Abschnitt 4.4.2) das Porenvolumen des Papierkanals auf einer Länge von a' zu $0,8 \mu\text{L}$. Unter Einbezug der Dichte für Wasser berechnete sich m (Wasser) folglich auf $0,8 \text{ mg}$.

$$V_{\text{Pore}} = a' \cdot b \cdot c \cdot P \quad (18)$$

Das Trockengewicht der gequollenen Fasern auf der von der Wasserfront zwischen Farbauftrag und Ende zurückgelegten Strecke a (hier $3,5 \text{ cm}$) wurde nach Gleichung 19 berechnet. Mit einem Flächengewicht von $A = 45 \text{ g m}^{-2}$ ergab sich m (Faser, trocken) zu $\sim 6,3 \text{ mg}$.

$$m(\text{Faser, trocken}) = a \cdot b \cdot A \quad (19)$$

Schließlich ergab sich ein FSP von $0,13 \text{ g g}^{-1}$ (Gleichung 1), was innerhalb des Spektrums der Literatur bekannten Werte liegt. Dieses Ergebnis unterstützt die beschriebene Theorie.

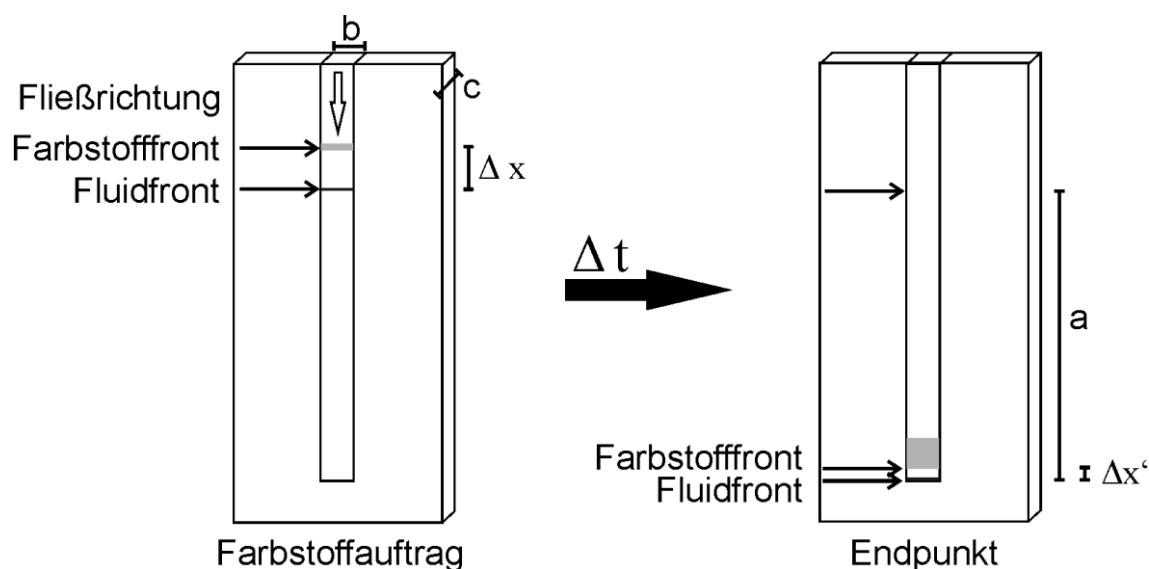


Abbildung 54: Schematisch Darstellung zur Verdeutlichung der relevanten Parameter zur Berechnung des Faserfeuchtigkeitssättigungspunkt (FSP).^[132]

Bei einer detaillierteren Betrachtung des Verlaufs der R_F -Werte für Methylenblau in Abhängigkeit des pH-Werts fiel auf, dass die Werte im Rahmen der Fehler für pH 3–9 konstant bei einem geringen R_F -Wert von 0,2 lagen (Abbildung 52). Dies entsprach den Erwartungen einer starken Retention, begründet in der gegennamigen Ladung der Farbstoffmoleküle und Cellulosefasern. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Batmaz *et al.*^[112] für die Adsorption von Methylenblau an nanokristalliner Cellulose bei verschiedenen pH-Werten überein. Die von Kaewprasit *et al.*^[113] getroffene Aussage, dass die Methylenblauretention hauptsächlich auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen beruht, konnte anhand dieser Messergebnisse nicht bestätigt, allerdings auch nicht widerlegt werden.

Für pH 1 wurde ein nicht signifikant erhöhter R_F -Wert beobachtet. Das ließ vermuten, dass die Retention bei pH 1 für Methylenblau leicht abnimmt. Es ist bekannt, dass sich die positive Nettoladung des Farbstoffmoleküls für pH > 1,8 auf +2 erhöht (Abschnitt 5.1.2), allerdings war die Ladung der Cellulosefasern bei diesem pH-Wert nicht messbar (Abschnitt 4.3). Bei der Diskussion der R_F -Werte von Tartrazin wurde bereits ein leicht positives Zetapotential bei pH 1 vermutet. Diese Annahme würde auch den leicht erhöhten R_F -Wert von Methylenblau bei pH 1 erklären, denn eine gleichnamige Ladung resultiert in reduzierter Retention.

Analyse der Bandenverbreiterung (B_V) von Tartrazin und Methylenblau

Die Ergebnisse der Bandenverbreiterung korrelierten im Wesentlichen mit den Ergebnissen der Retentionsfaktoren. Für Tartrazin war für pH 1–9 eine im Rahmen des Fehlers konstante Bandenverbreiterung im mittleren Wertebereich ($B_V \sim 0,6$) zu beobachten. Dies ließ auf eine konstante, mittlere Retention der Tartrazinmoleküle an den Cellulosefasern in diesem pH-Wertbereich schließen und bestätigte die Ergebnisse der R_F -Werte. Für stark basische pH-Werte (pH 10, 13) nahm die Bandenverbreiterung deutlich ab, was auf eine deutliche Reduktion der Retention schließen ließ. Auch diese Werte bestätigten die Ergebnisse der R_F -Werte.

Die Bandenverbreiterung für Methylenblau lag für alle pH-Werte beim Maximalwert ($B_V(\max)$) von 1 und damit deutlich über den Werten für Tartrazin. Folglich war die Retention des positiv geladenen Farbstoffs deutlich höher als die des negativ geladenen. Auch dies entsprach den Erwartungen nach dem beobachteten Verlauf der R_F -Werte. Ein Wert von 1 für B_V bedeutet

anschaulich, dass sich die Farbstoffmoleküle über die gesamte zurückgelegte Strecke verteilen. Diese Beobachtung könnte sich damit erklären lassen, dass aufgrund der starken elektrostatischen Wechselwirkung zwischen gegennamig geladenen Molekülen und Fasern zumindest ein Teil der Farbstoffmoleküle dauerhaft physisorbiert^[112] wurden. Im Gegensatz dazu fand bei Tartrazinmolekülen auch eine Desorption statt, was die insgesamt geringeren B_v -Werte erklären würde.

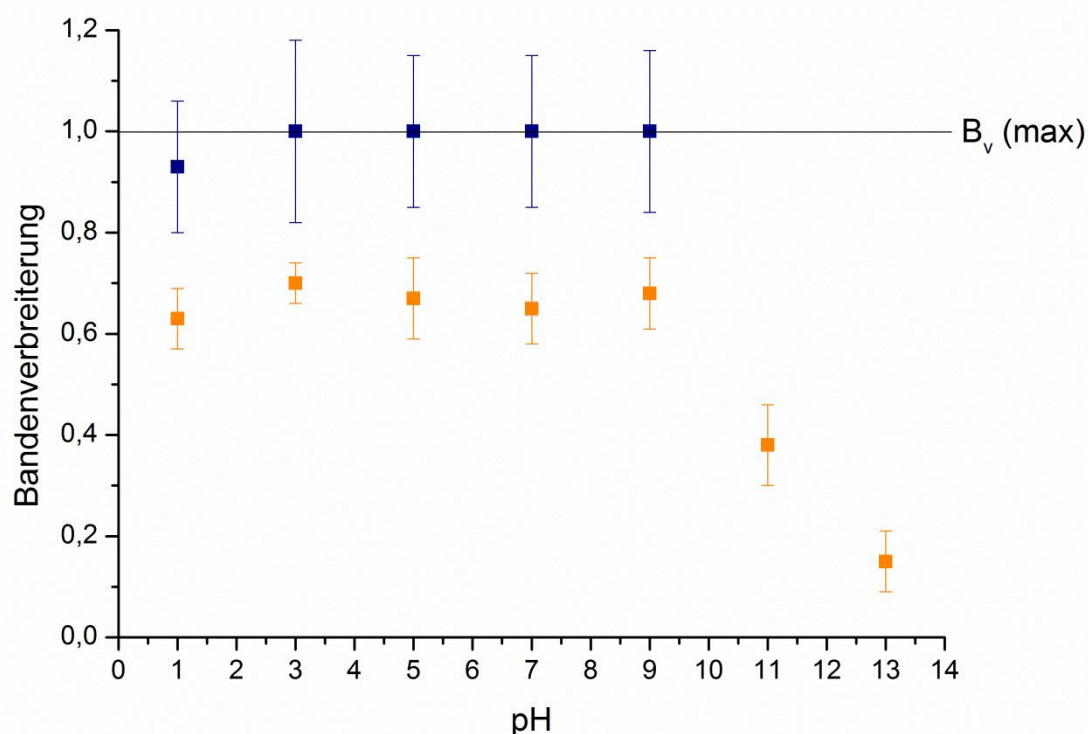


Abbildung 55: Bandenverbreiterung als Funktion des pH-Wertes für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 1–13, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$. Methylenblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 1–9, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$. Laufmittel: deion. H_2O , pH 1–13, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Eukalyptussulfatzellstoff. Die schwarze Linie symbolisiert die rechnerisch maximal mögliche Bandenverbreiterung.

Analyse der Laufzeiten der Proben

Die Zeit, die die Fluidfront benötigte den mikrostrukturierten Kanal vollständig zu passieren, wurde als Laufzeit der Probe festgehalten. Es wurde davon ausgegangen, dass die Laufzeit im Mittel für alle Proben eines Experiments konstant ist. Daher sollte sie keinen Einfluss auf die zu untersuchende Retention der Farbstoffe haben. Theoretisch begründet gilt diese Annahme, da der Fluidtransport in der porösen Papiermatrix nach Böhm *et al.*^[26] gut mit Hilfe des Lucas-Washburn-Modells beschrieben werden kann (vgl. Abschnitt 3.1.4). Sind die entscheidenden Parameter der Lucas-Washburn-Gleichung für alle Proben eines Experiments konstant, sollte auch die Laufzeit einer immer gleichen Kanalstrecke im Rahmen eines Messfehlers konstant sein. Durch Änderungen der fluiden Phase wurden die Parameter Kontaktwinkel, Oberflächenspannung und Porenradius nicht verändert. Darüber hinaus wurde angenommen, dass die Viskosität des Fluids durch die Variation des pH-Werts bzw. der Leitfähigkeit (Abschnitt 5.2.2) und der Analytkonzentration (Abschnitt 5.2.3), innerhalb der für die beschriebenen Experimente definierten Grenzen, nicht

entscheidend beeinflusst wird. Dennoch wurde die Gültigkeit der Annahme einer konstanten Laufzeit überprüft und diskutiert.

Die Fluidfront in den Experimenten zur pH-Wertabhängigkeit benötigte in den Messungen der Tartrazinproben im Mittel über alle pH-Werte 137 ± 11 s und bei den Methylenblauproben 136 ± 10 s, um das Ende des Kanals zu erreichen. Vorausgesetzt der pH-Wert hat keinen Einfluss auf die Laufzeit, sollte die Standardabweichung über die Mittelwerte bei verschiedenen pH-Werten nicht größer sein als die maximale Standardabweichung eines pH-Werts. Die maximale Standardabweichung eines pH-Werts für Tartrazin wurde bei pH 9 mit 19 s und für Methylenblau bei pH 5/9 mit 29 s beobachtet. Diese Werte waren größer als die beobachteten Standardabweichungen über alle pH-Werte von 11 s für Tartrazin bzw. 10 s für Methylenblau. Der Einfluss des pH-Werts auf die Laufzeit wurde folglich vernachlässigt (Details in Tabelle 18 in Abschnitt 9.6.2).

Der theoretisch begründete Ansatz wurde experimentell in Baumwollinterspapieren belegt. Im Rahmen des Fehlers konnte anhand eines Referenzexperiments (Abschnitt 9.6.2) kein Einfluss des pH-Werts auf die Laufweite des Fluids in mikrostrukturierten Kanälen beobachtet werden.

5.2.2. Einfluss der elektrischen Leitfähigkeit auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau

Unter realen Bedingungen liegen meist keine reinen Lösungen einer Modellschubstanz zur Analyse vor. Stattdessen sind komplexe Mischungen (z.B. Blut, Urin) die Regel. Folglich müssen solche Fluide vor einer Analyse mittels *Lab-on-a-chip-Device* entweder aufwendig aufgereinigt werden, oder die Assays müssen so aufgebaut sein, dass eine Analyse der komplexen Probe direkt möglich ist. Daher sollte in diesem Abschnitt zunächst der Einfluss von Salz auf die Retention der Modellfarbstoffe untersucht werden. Dazu wurde mit Hilfe von Natriumchlorid die elektrische Leitfähigkeit κ der Probelösungen und des Fluids auf drei verschiedene Leitfähigkeiten (1; 25; 48,5 mS cm⁻¹) eingestellt und der Einfluss der variierenden Leitfähigkeit auf die Retention untersucht. Allerdings sind in eine Probelösung häufig nicht nur potentielle "Störstoffe" wie Salze enthalten. Oft enthalten Probelösungen auch mehrere Analyten, die im Optimalfall parallel untersucht werden sollen. In keinem Fall darf dabei ein Analyt die Analyse eines anderen Analyten beeinträchtigen. Daher wurde im zweiten Teil dieses Abschnitts eine komplexe Probelösung aus einer Mischung von Methylenblau (0,6 mmol L⁻¹) und Tartrazin (4 mmol L⁻¹) mit verschiedenen Anteilen an Salzen ($\chi = 1; 25; 48,5$ mS cm⁻¹) untersucht.

Als Untergrenze für die Analyse der Leitfähigkeit wurde 1 mS cm⁻¹ gewählt, da deionisiertes Wasser, das mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 7 eingestellt wurde, eine Leitfähigkeit in dieser Größenordnung aufweist. Als Obergrenze wurden 48,5 mS cm⁻¹ gewählt, da Vorexperimente zeigten, dass deutlich höhere Salzkonzentrationen zu einem Ausfall der Farbstoffe führen. Dies liegt vermutlich in einer geringeren Löslichkeit als NaCl (358 g L⁻¹^[107]) in wässriger Lösung begründet (Abschnitt 9.6.3). Konkret konnte festgestellt werden, dass bei Zugabe von NaCl in wässriger Lösung Methylenblau ($c = 0,6$ mmol L⁻¹) bei pH 3 bei einer Leitfähigkeit von 50 mS cm⁻¹ und Tartrazin ($c = 0,4$ mmol L⁻¹) bei pH 5 bei einer Leitfähigkeit von 61 mS cm⁻¹ ausfällt. Als mittlerer Wert zur Untersuchung der Leitfähigkeit zwischen Ober- und Untergrenze wurde 25 mS cm⁻¹ definiert. Alle anderen Parameter (pH-Wert, Farbstoffkonzentration, Fasertyp und Flächengewicht) wurden konstant gehalten (Details der Durchführung in Abschnitt 9.6.3). Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 56 exemplarisch Graustufenscans von Retentionsexperimenten bei den drei verschiedenen Leitfähigkeiten für Tartrazin und Methylenblau dargestellt.

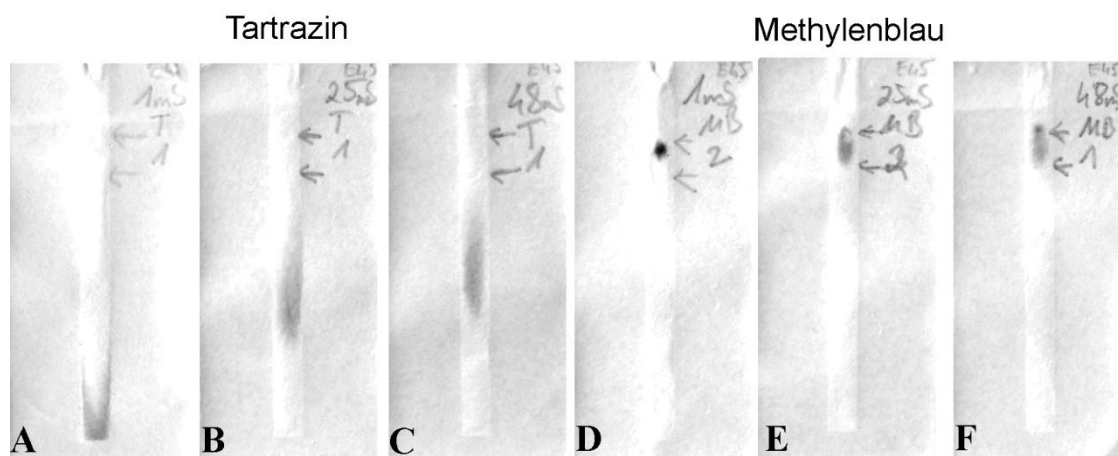


Abbildung 56: (A–C) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Tartrazinlösungen (4 mmol L^{-1} , pH 7) bei 1 mS cm^{-1} , 25 mS cm^{-1} und $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$ (von links nach rechts). (D–F) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Methylenblaulösungen ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7) bei 1 mS cm^{-1} , 25 mS cm^{-1} und $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$ (von links nach rechts).

Analyse des Retentionsfaktors von Methylenblau und Tartrazin

Im Vergleich der R_f -Werte von Methylenblau und Tartrazin (Abbildung 57) fiel auf, dass die Leitfähigkeit auf die Retention von Tartrazin einen deutlichen Einfluss hat, während dieser Einfluss für Methylenblau nicht beobachtet werden konnte.

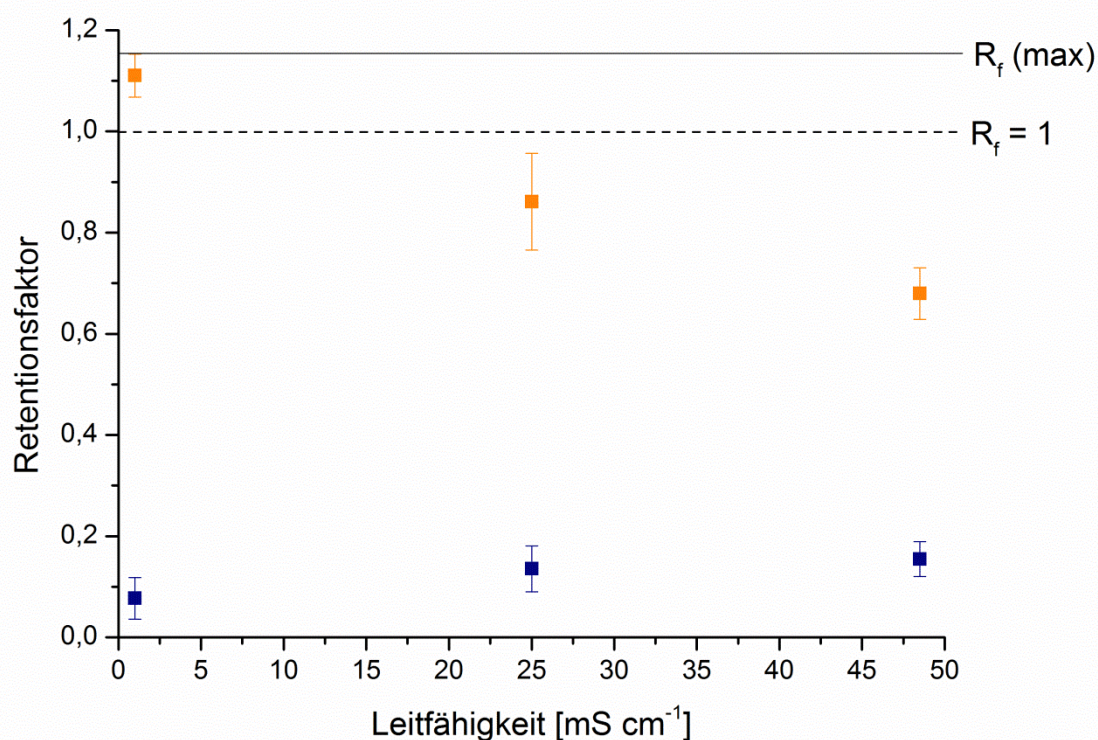


Abbildung 57: Retentionsfaktor als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylenblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Laufmittel: deion. H_2O , pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Eukalyptussulfatzellstoff. Die schwarze Linie symbolisiert den rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor. Die gestrichelte Linie markiert den üblicherweise maximalen Retentionsfaktor bei 1.

Methylenblau wies für alle Leitfähigkeiten im Rahmen des Fehlers den gleichen geringen R_F -Wert von ca. 0,1–0,2 auf. Es wurde folglich, wie erwartet, stark reterniert. Ein nicht signifikanter Anstieg des R_F -Werts Richtung höherer Leitfähigkeiten war zu beobachten. Dies entspricht den Beobachtungen von Batmaz *et al.*^[112] Sie beschrieben einen leichten Rückgang der Adsorption (Erhöhung des R_F -Werts) von Methylenblau in nanokristalliner Cellulose bei einer Ionenkonzentration von NaCl bis zu 1600 mg L⁻¹ ($\kappa(\text{NaCl}) = 3,16 \text{ mS cm}^{-1}$). Dies führten sie auf die erhöhte Zahl an Kationen zurück, die mit den positiv geladenen Methylenblaumolekülen um Adsorptionsplätze konkurrieren. Natürlich ist dieser Trend mit den dargestellten Messungen nur bedingt vergleichbar, da er sich auf einen deutlich geringeren Leitfähigkeitsbereich bezieht. Auch Palit *et al.*^[92] beschrieben eine verlangsamte Adsorption bei Anwesenheit von Salz aufgrund einer geringeren Wechselwirkung der Methylenblaumoleküle und der Cellulose.

Die Retention von Tartrazin hingegen schien durch die Leitfähigkeit stark beeinflusst zu sein. Der R_F -Wert zwischen der höchsten und geringsten Leitfähigkeit variierte deutlich um 0,43. Eine höhere Leitfähigkeit schien zu einer höheren Adsorption (geringerer R_F -Wert) zu führen. Dies stimmte mit den Beobachtungen von Shiralipour *et al.*^[104b] überein, die einen Einfluss auf die Adsorption von Tartrazin ab einer Ionenkonzentration von 1000 mg L⁻¹ für Na⁺-Ionen beobachteten ($\kappa(\text{NaCl}) = 2,02 \text{ mS cm}^{-1}$). Dieses Phänomen könnte so erklärt werden, dass bei einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Tartrazin und den Cellulosefasern, eine erhöhte Anzahl positiver Ionen auf den negativen Cellulosefasern abgeschieden werden. Diese könnten eine Art "Pufferschicht" bilden und so die erhöhte Adsorption der ebenfalls negativ geladenen Farbstoffmoleküle unterstützen (Abbildung 58).

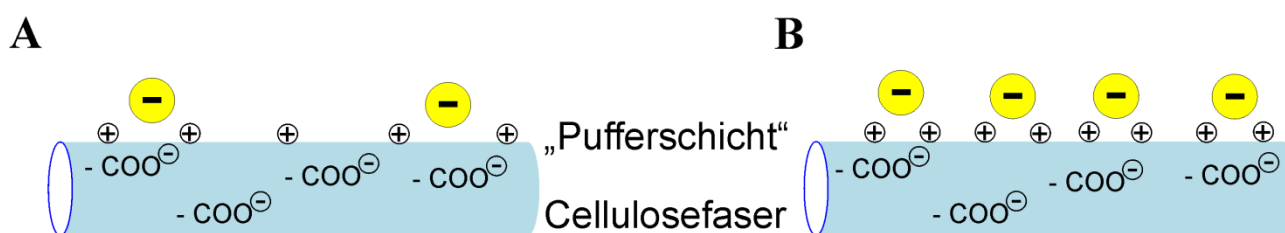


Abbildung 58: Schematische Darstellung des Modells zur Retention von Tartrazinmolekülen (gelb) bei verschiedenen Leitfähigkeiten. (A) Eine geringe Leitfähigkeit resultiert in einer geringen Anzahl an positiven Ionen, die sich auf der negativ geladenen Cellulosefaser als "Pufferschicht" abscheiden. Folglich werden weniger Tartrazinmoleküle reterniert. (B) Bei einer erhöhten Leitfähigkeit wird eine erhöhte Anzahl an positiven Ionen auf der Cellulosefaser als Pufferschicht gebunden, sodass aufgrund der erhöhten positiven Ladung mehr negativ geladene Tartrazinmoleküle reterniert werden können.

Analyse der Bandenverbreiterung von Methylenblau und Tartrazin

Die Änderung der Bandenverbreiterung korrelierte mit den Beobachtungen für die Änderung des R_F -Werts in Abhängigkeit der Leitfähigkeit. Methylenblau zeigte einen hohen, über alle Leitfähigkeiten konstanten Wert, der für eine starke, von der Leitfähigkeit unbeeinflusste, Retention sprach. Für Tartrazin nahm die Bandenverbreiterung mit der Leitfähigkeit zu. Auch dies entsprach der Erwartung, dass eine Erhöhung der Leitfähigkeit die Retention grundsätzlich erhöht.

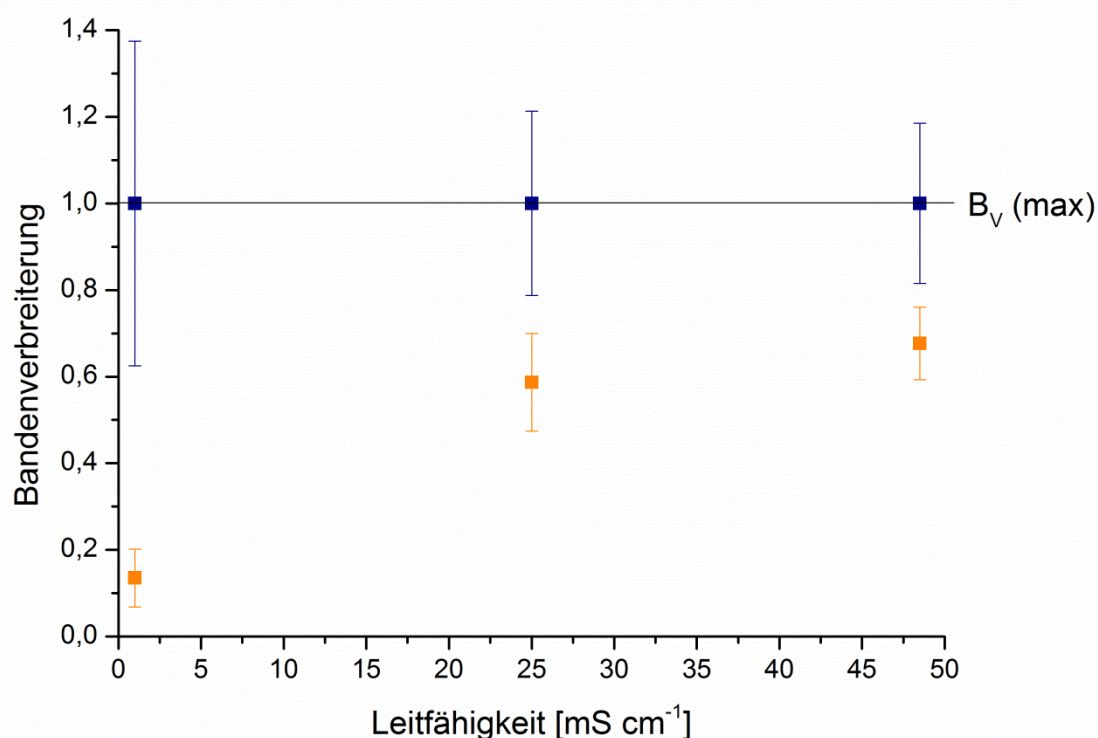


Abbildung 59: Bandenverbreiterung als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L⁻¹, pH 7, $\chi = 1$; 25; 48,5 mS cm⁻¹; Methylenblaulösung: 0,6 mmol L⁻¹, pH 7, $\chi = 1$; 25; 48,5 mS cm⁻¹; Laufmittel: deion. H₂O, pH 7, $\chi = 1$; 25; 48,5 mS cm⁻¹; Papiersubstrat: 45 g m⁻² Eukalyptussulfatzellstoff. Die schwarze Linie symbolisiert die rechnerisch maximal möglichen Bandenverbreiterung.

Auftrennung komplexer Farbstoffgemische

In Hinblick auf mögliche Anwendungen von *Lab-on-a-chip-Devices* (Abschnitt 1.4) ist eine gezielte Auftrennung unterschiedlich geladener Analyten von Interesse. Ziel ist dabei eine erhöhte Spezifität von *Lateral Flow Assays*, durch ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis beispielsweise durch Abtrennung von detektionsstörenden Stoffen, wie z.B. rote Blutkörperchen (vgl. Kapitel 2). Folglich sollte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die ladungsbasierte, stark unterschiedliche Retention der beiden Modellfarbstoffe in Papier dafür genutzt werden konnten, eine Auftrennung einer Mischung beider Analyten in *Lab-on-a-chip-Devices* zu ermöglichen (Abbildung 60). Der beschriebene Einfluss der Leitfähigkeit auf die Retention von Tartrazin sollte genutzt werden, um diese Auftrennung zu optimieren.

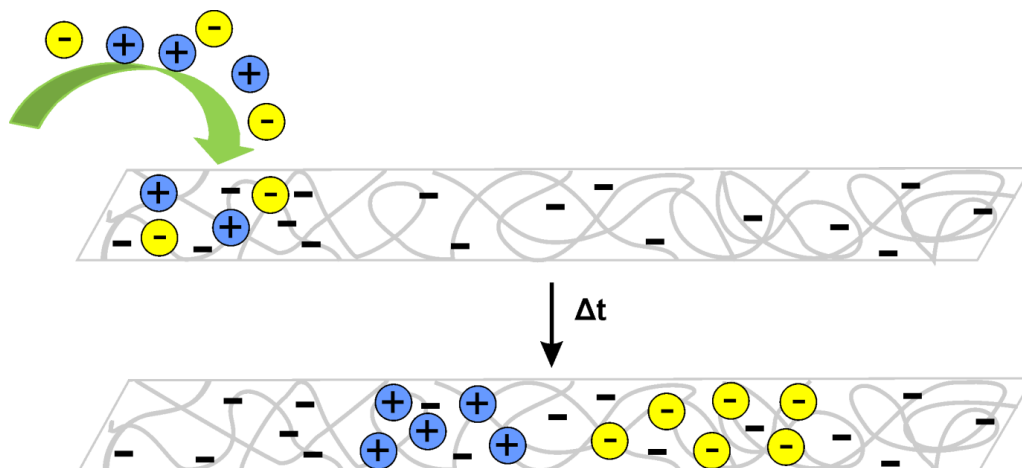


Abbildung 60: Schematische Darstellung der auf elektrostatischer Wechselwirkung beruhenden Auftrennung des Farbstoffgemisches. Der negativ geladene Modellfarbstoff Tartrazin wird mit nur geringer Retention kapillarkraftgetrieben durch das negativ geladene Cellulosefasernetzwerk transportiert. Die positiv geladenen Methylenblaumoleküle werden deutlich stärker reterniert. Folglich werden sie im vorderen Bereich des mikrostrukturierten Kanals immobilisiert während die Tartrazinmoleküle weiter transportiert werden, was zu einer Auftrennung des Farbstoffgemischs führt.

Es wurde eine Mischung von gelöstem Tartrazin und Methylenblau in Wasser (Abbildung 61D) bei verschiedenen Leitfähigkeiten analysiert (Details der Durchführung in Abschnitt 9.6.3). Abbildung 61A–C zeigt die Auftrennung des Farbstoffgemischs bei verschiedenen Leitfähigkeiten. Eine gute Trennung war bei der geringsten Leitfähigkeit (1 mS cm^{-1}) zu beobachten. Für höhere Leitfähigkeiten (25 mS cm^{-1} und $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$) konnte die Mischung nicht vollständig aufgetrennt werden (Abbildung 61 grüne Pfeile). Diese Beobachtungen werden in Abbildung 62 und Abbildung 63 anhand der R_f - und B_V -Wert quantifiziert und mit den Werten der reinen Farbstofflösungen bei verschiedenen Leitfähigkeiten verglichen.

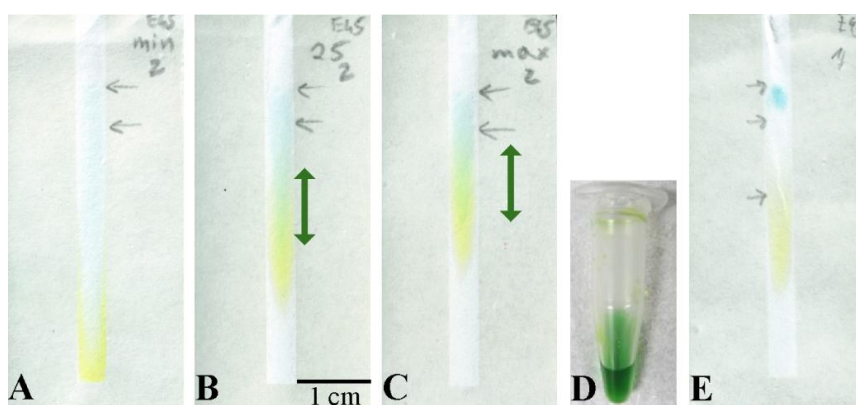


Abbildung 61: (A–C) Fotografien der Separationsexperimente von Farbstoffmischungen (Lösung von 4 mmol L^{-1} Tartrazin und $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ Methylenblau in Wasser bei Leitfähigkeiten von links nach rechts von 1 mS cm^{-1} , 25 mS cm^{-1} und $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$). Grüner Pfeil verdeutlicht Überlappungsbereich der beiden Farbstoffe. (D) Fotografie der verwendeten Farbstoffmischung (4 mmol L^{-1} Tartrazin und $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ Methylenblau in Wasser). (E) Fotografie des Vergleichsexperiments (Lösung von 4 mmol L^{-1} Tartrazin und $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ Methylenblau in Wasser, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$ nacheinander aufgetragen).^[132]

Dabei fiel auf, dass unabhängig davon, ob die Retention der reinen Tartrazinlösung oder der Lösung mit Methylenblau untersucht wurde, R_f und B_V im Rahmen der Fehler gleich waren. Dies stimmte nicht mit den Ergebnissen von Shiralipou *et al.*^[104b] überein, die den Einfluss von Methylenblau auf

die Adsorption von Tartrazin untersuchten und ab einer Konzentration von 50 mg L^{-1} Methylenblau (hier 200 mg L^{-1}), eine Änderung des Adsorptionsverhaltens von Tartrazin feststellen konnten. Dieser Widerspruch kann vermutlich auf die unterschiedlichen Substratmaterialien zurückgeführt werden.

Für Methylenblau konnte im Gegensatz dazu eine deutliche Änderung des R_f -Wert im Vergleich von reiner Lösung und Lösung mit Tartrazin beobachtet werden. Der deutlichste Unterschied war bei der geringsten Leitfähigkeit zu beobachten. Es wird vermutet, dass dies auf eine Komplexbildung der beiden gegensätzlich geladenen Farbstoffmoleküle in Lösung zurückzuführen ist, wie Palit *et al.*^[92] dies für Methylenblau und Methylorange beschrieben. Vermutlich bildeten beide Farbstoffe einen Komplex, der die positive Ladung des Methylenblaus teilweise ausglich und so dafür sorgte, dass der an sich positiv geladene Farbstoff auch im negativ geladenen Fasernetzwerk teilweise transportiert werden konnte. Wechselwirkungen mit Fasern sorgten nach und nach für eine Auftrennung des Komplexes und immobilisieren Methylenblaumoleküle an der Faseroberfläche. Dies würde die konstant hohen B_V erklären.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde schließlich im gleichen Kanal keine Mischung der beiden Farbstoffe, sondern ein Farbstoff nach dem anderen aufgetragen (vgl. Abbildung 61E) (Details der Durchführung in Abschnitt 9.6.3). Es wurde kein Einfluss der MethylenblauRetention durch Tartrazin oder umgekehrt beobachtet. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie einer Komplexbildung zwischen den beiden Farbstoffmolekülen. Offensichtlich findet keine Beeinflussung der Retention der Farbstoffmoleküle aufeinander statt, wenn diese getrennt aufgetragen werden und so nicht die Möglichkeit zur Komplexbildung hatten.

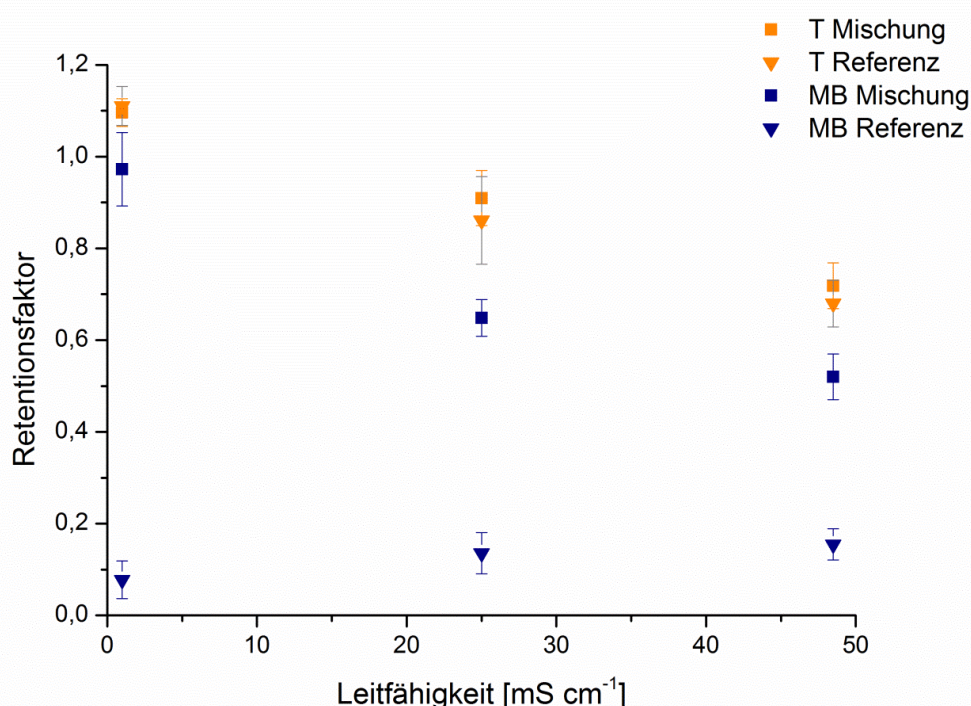


Abbildung 62: Retentionsfaktor als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte Tartrazin- (orange, Dreieck) und Methylenblaulösung (blau, Dreieck). Im Vergleich zu einer Mischung aus Tartrazin- (orange, Quadrat) und Methylenblaulösung (blau, Quadrat). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylenblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Mischung: Tartrazin (4 mmol L^{-1}), Methylenblau ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) in deion. Wasser, pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$ Laufmittel: deion. H_2O , pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Eukalyptussulfatzellstoff.^[132]

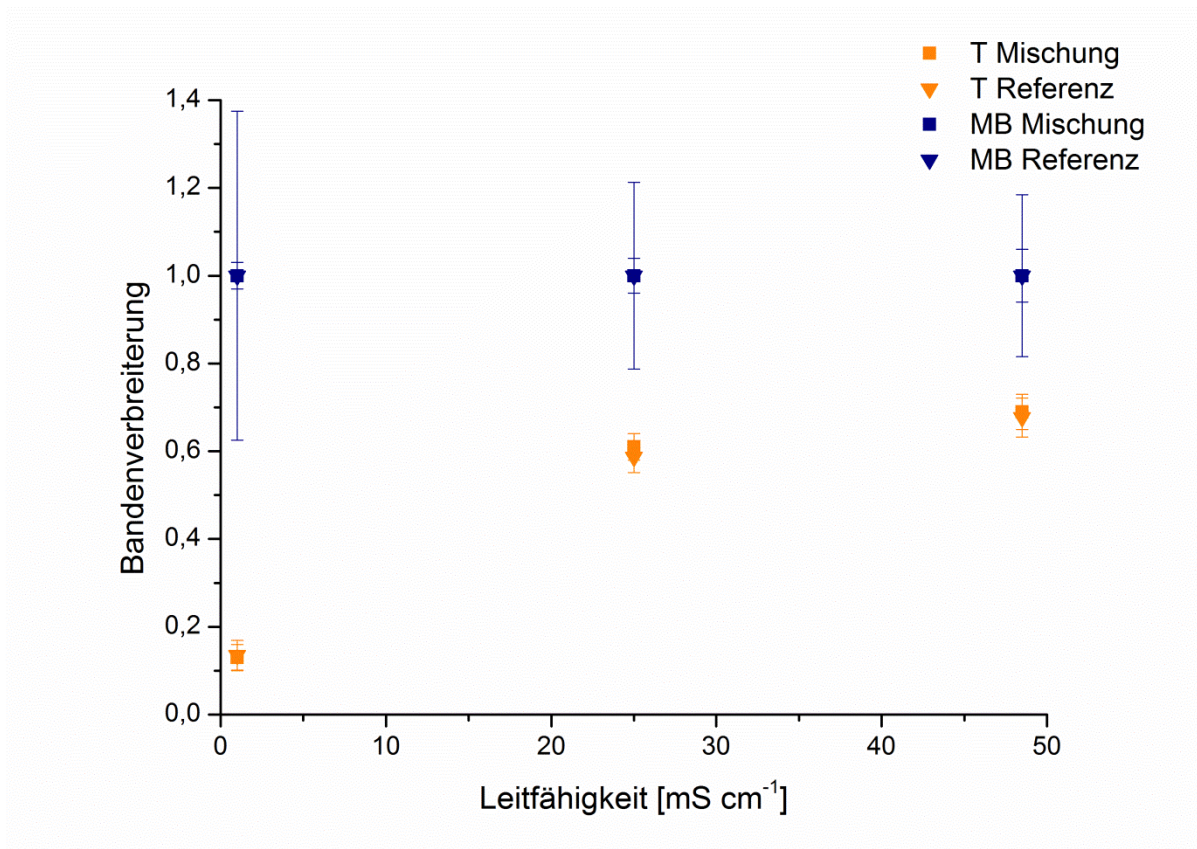


Abbildung 63: Bandenverbreiterung als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte Tartrazin- (orange, Dreieck) und Methylenblaulösung (blau, Dreieck). Im Vergleich zu einer Mischung aus Tartrazin- (orange, Quadrat) und Methylenblaulösung (blau, Quadrat). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylenblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Mischung: Tartrazin (4 mmol L^{-1}), Methylenblau ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) in deion. Wasser, pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$ Laufmittel: deion. H_2O , pH 7, $\chi = 1$; 25; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$; Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Eukalyptussulfatzellstoff.

Laufzeiten komplexer Farbstoffgemische

Die Fluidfront benötigte in den Messungen der Tartrazinproben im Mittel über die drei Leitfähigkeiten $120 \pm 5 \text{ s}$ und bei den Methylenblauproben $112 \pm 7 \text{ s}$, um das Ende des Kanals zu erreichen. Vorausgesetzt die Leitfähigkeit hätte keinen Einfluss auf die Laufzeit, sollte die Standardabweichung über die Mittelwerte bei verschiedenen Leitfähigkeiten nicht größer sein, als die maximale Standardabweichung bei einer Leitfähigkeit. Die maximale Standardabweichung einer Leitfähigkeit für Tartrazin wurde bei $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$ mit 7 s und für Methylenblau ebenfalls bei $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$ mit 7 s beobachtet. Diese Werte waren ähnlich den beobachteten Standardabweichungen über alle Leitfähigkeiten von 5 s für Tartrazin bzw. 7 s für Methylenblau. Der Einfluss der Leitfähigkeit auf die Laufzeit wurde folglich vernachlässigt (Details in Tabelle 19 in Abschnitt 9.6.3).

Auch für die Auftrennung der Farbstoffmischungen (Abschnitt 9.6.3) wurde der Einfluss der Leitfähigkeit auf die Laufzeit evaluiert. Die Fluidfront benötigte im Mittel über alle drei Leitfähigkeiten $136 \pm 3 \text{ s}$, um das Ende des Kanals zu erreichen. Die maximale Standardabweichung einer Leitfähigkeit wurde bei 25 mS cm^{-1} mit 16 s beobachtet und ist damit größer als die Standardabweichung über alle drei Leitfähigkeiten. Der Einfluss der Leitfähigkeit auf die Laufzeit wurde folglich auch hier vernachlässigt (Details in Tabelle 20 in Abschnitt 9.6.3).

Der theoretisch begründete Ansatz wurde experimentell in Baumwollinterspapieren belegt. Im Rahmen des Fehlers konnte anhand eines Referenzexperiments (Abschnitt 9.6.3) kein Einfluss der

Leitfähigkeit auf die Laufweite des Fluids in mikrostrukturierten Kanälen bis zu einer Leitfähigkeit von etwa 100 mS cm^{-1} beobachtet werden. Darüber hinaus nahm sie mit zunehmender Leitfähigkeit leicht ab. Da die verwendeten Pufferlösungen alle eine Leitfähigkeit $<100 \text{ mS cm}^{-1}$ aufwiesen, konnte der Einfluss der Leitfähigkeit auf die Laufweite vernachlässigt werden.

5.2.3. Einfluss der Farbstoffkonzentration auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau

Es ist zu erwarten, dass zu analysierende Substanzen in biologischen Proben zwar in einem definierten unter Umständen aber weiten Konzentrationsbereich vorliegen. Daher sollte in diesem Abschnitt anhand der Modellfarbstoffe der Einfluss der Analytkonzentration auf deren Retention untersucht werden.

Die Konzentration beider Farbstoffe wurde jeweils über drei Zehnerpotenzen hinweg analysiert. Als Untergrenze wurde dabei die Konzentration gewählt, die in Vorexperimenten gerade noch detektierbar war. Für Tartrazin entsprach das einer Konzentration von $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ und für Methylenblau einer Konzentration von $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Aufsteigend wurden für Tartrazin folglich zusätzlich die Konzentrationen 4 und 40 mmol L^{-1} und für Methylenblau die Konzentrationen 6 und 60 mmol L^{-1} untersucht. Alle anderen Parameter (pH-Wert, Leitfähigkeit, Fasertyp und Flächengewicht) wurden konstant gehalten (Details der Durchführung in Abschnitt 9.6.4). Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 64 exemplarisch Graustufenscans von Retentionsexperimenten bei den drei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen für Tartrazin und Methylenblau dargestellt.

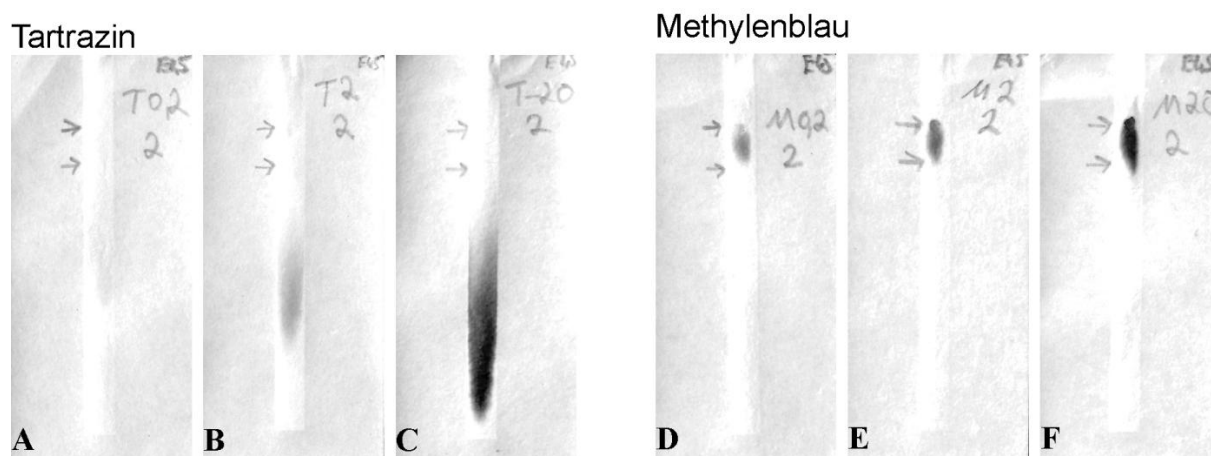


Abbildung 64: (A–C) Exemplarische Graustufenscans der Kanäle nach den Retentionsexperimenten für Tartrazinlösungen ($\text{pH } 7$, 25 mS cm^{-1}) mit Farbstoffkonzentration von $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, 4 mmol L^{-1} und 40 mmol L^{-1} (von links nach rechts). (D–F) Exemplarische Graustufenscans der Kanäle nach den Retentionsexperimenten für Methylenblaulösungen ($\text{pH } 7$, 25 mS cm^{-1}) mit Farbstoffkonzentration von $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, 6 mmol L^{-1} und 60 mmol L^{-1} (von links nach rechts).

Retentionsfaktor von Tartrazin und Methylenblau bei variablen Farbstoffkonzentrationen

Abbildung 65 zeigt den Einfluss der Farbstoffkonzentration auf den Retentionsfaktor. Es konnte festgestellt werden, dass der Retentionsfaktor von Tartrazin mit abnehmender Analytkonzentration ebenfalls abnimmt.

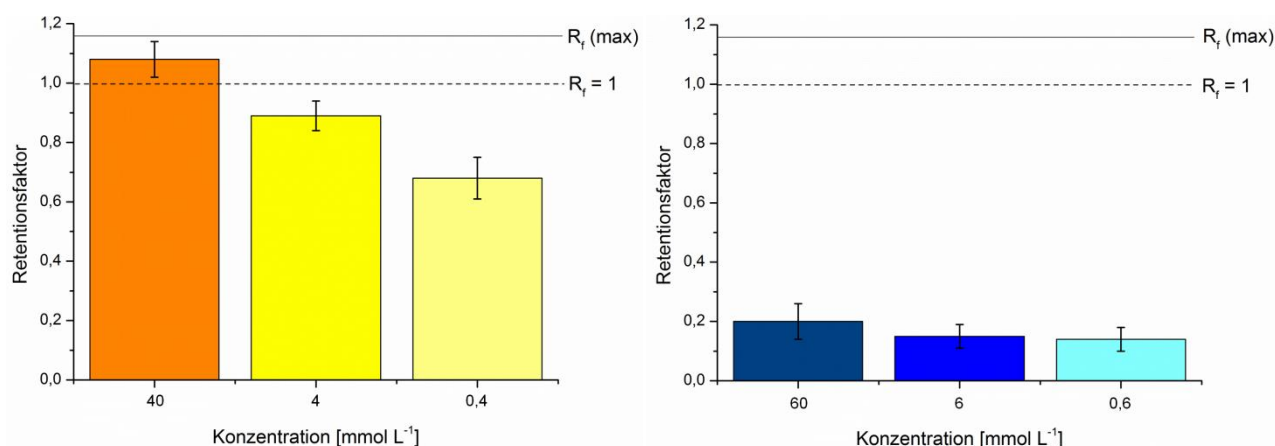
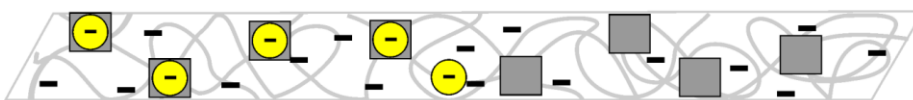


Abbildung 65: Retentionsfaktor in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für applizierte Tartrazin- (links) und Methylblaulösung (rechts). Tartrazinlösung: 40, 4, 0,4 mmol L⁻¹, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylblaulösung: 60, 6, 0,6 mmol L⁻¹, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Laufmittel: deion. H₂O, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Papiersubstrat: 45 g m⁻² Eukalyptussulfatzellstoff. Die schwarze Linie symbolisiert den rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor. Die gestrichelte Linie markiert den üblicherweise maximalen Retentionsfaktor bei 1.

Dies lässt sich erklären, wenn berücksichtigt wird, dass nach Banerjee *et al.*^[104a] beispielsweise die Adsorption von Tartrazin an Sägemehl nach einer Dubini-Radushkevich-Isotherme also als Monolage beschrieben wurde. Wie Banerjee *et al.*^[104a] festgehalten haben, ist folglich keine Adsorption mehr möglich, sobald alle Adsorptionsplätze besetzt sind. Eine abstoßende Wechselwirkung zwischen Adsorbat und Adsorptiv verhindert weitere Adsorption. Unter der Annahme, dass sich Papier ähnlich wie das beschriebene Sägemehl verhält, kann vermutet werden, dass sobald in einem Kanalabschnitt alle Adsorptionsplätze besetzt sind, keine Adsorption der Tartrazinmoleküle in diesem Bereich mehr stattfindet. Stattdessen wurden die Moleküle vermutlich kapillarkraftgetrieben in der Lösung weiter transportiert und erreichten so einen "weiter vorne liegenden" Kanalabschnitt, der noch keine Farbstoffmoleküle adsorbiert hat. Die bisher nicht adsorbierten Farbstoffmoleküle adsorbierten folglich in diesem Bereich, bis auch hier alle Adsorptionsplätze besetzt waren. Mögliche Desorptionsprozesse wurden vernachlässigt. Im beschriebenen Fall wäre die beobachtete Zunahme des R_f-Werts bei zunehmender Konzentration folglich nicht auf eine Abnahme der Retention, sondern lediglich auf die größere Anzahl an Farbstoffmolekülen bei gleichbleibender Zahl an Adsorptionsplätzen zurückzuführen. Einige Moleküle wurde innerhalb des Fasernetzwerks des mikrostrukturierten Kanals weiter transportiert als zu erwarten, da sie an besetzten Adsorptionsplätzen nicht adsorbiert werden konnten. Dieser Vorgang soll im Folgenden kurz als "Überladungseffekt" bezeichnet werden (Abbildung 66).

geringe Farbstoffkonzentration



hohe Farbstoffkonzentration

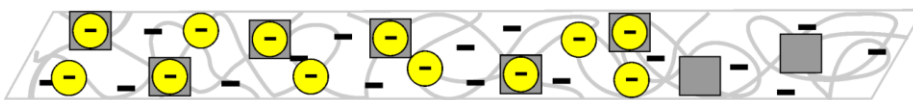


Abbildung 66: Schematische Darstellung des "Überladungseffekts". Bei einer geringen Farbstoffkonzentration (oben) sind mehr Adsorptionsplätze (graue Quadrate) als Tartrazinfarbstoffmoleküle (gelb) in einem Teilabschnitt des Fasernetzwerk des Kanals vorhanden. Jedes Farbstoffmolekül wird direkt adsorbiert. Bei einer erhöhten Farbstoffkonzentration (unten) sind mehr Farbstoffmoleküle als Adsorptionsplätze in einem Teilabschnitt des Fasernetzwerks des Kanals vorhanden. Dadurch werden die Farbstoffmoleküle über diesen Kanalabschnitt hinaus transportiert, denn sie können nicht an bereits besetzte Adsorptionsplätze adsorbieren. Freie Adsorptionsplätze können erst in weiter vorne liegenden Kanalabschnitten erreicht werden, sodass makroskopisch betrachtet der R_F -Wert bei einer höheren Farbstoffkonzentration steigt, obwohl der Adsorptionsmechanismus unverändert bleibt.

Für Methylenblau war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, wenn auch in deutlich geringerem Maße und nicht signifikant. Batmaz und Kaewprasit *et al.*^[112-113] beschrieben auch für die Adsorption von Methylenblau in diesem Fall an nanokristalliner Cellulose bzw. wassergequollener Cellulose eine Langmuir-Isotherme (Monolage). Eine Erklärung für den deutlich geringeren Einfluss bei Methylenblauolekülen könnte eine geringer Zahl der Adsorptionsplätze in einem Kanalabschnitt aufgrund eines anderen Adsorptionsmechanismus sein. Dieser könnte, trotz einer leicht höheren Konzentration an Methylenblauolekülen, zu einer geringeren Auswirkung auf den Retentionsfaktor führen. Diese Vermutung wurde unterstützt durch die in der Literatur als unterschiedlich beschriebene Thermodynamik der Adsorptionsprozesse der beiden Farbstoffe an celluloseähnliche Materialien. Während Tartrazin nach Banerjee *et al.*^[104a] endotherm und folglich entropiegetrieben an Sägemehl physisorbiert, wird die Adsorption von Methylenblau an nanokristalline Cellulose nach Batmaz *et al.*^[112] enthalpisch und entropisch begünstigt. Dieser Unterschied legt verschiedene Adsorptionsmechanismen nahe, die neben dem offensichtlichen Einfluss auf den Absolutwert des Retentionsfaktors (vgl. auch Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2) auch die geringere relative Änderung aufgrund eines Überladungseffektes erklären könnten.

Bandenverbreiterung von Tartrazin und Methylenblau in konzentrationsabhängigen Messungen

Abbildung 67 zeigt, dass die Bandenverbreiterung von Tartrazin mit der Farbstoffkonzentration abnahm. Dies ließe sich anhand des beschriebenen Überladungseffektes erklären. Werden bei einer höheren Konzentration an Analyt insgesamt mehr Adsorptionsplätze, folglich ein größerer Abschnitt des mikrostrukturierten Kanals belegt, ist auch der gefärbte Abschnitt und damit der Wert der Bandenverbreiterung größer.

Für Methylenblau wurde im Gegensatz dazu eine für alle Konzentrationen gleiche maximale Bandenverbreiterung beobachtet. Dies unterstützte die Vermutung, dass die Adsorption der beiden Farbstoffe nach unterschiedlichen Prozessen abläuft. Da die Methylenblauadsorption nach bisherigen Ergebnissen vermutlich hauptsächlich auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen positiv geladenen Farbstoffmolekülen und negativ geladenen Cellulosefasern beruht, war

eine Adsorption von Methyleneblaumolekülen deutlich stabiler als die von negativ geladenen Tartrazinmolekülen. Dies führte dazu, dass an jeder Stelle des mikrostrukturierten Kanals, der bereits mit dem Methyleneblaulösung in Kontakt gekommen war, Methyleneblaumoleküle adsorbiert blieben. Im Gegensatz dazu können Tartrazinmoleküle vermutlich auch wieder desorbiert werden und wurden nicht dauerhaft über den gesamten passierten Kanalbereich gebunden. Dies reduzierte effektiv den Wert der Bandenverbreiterung.

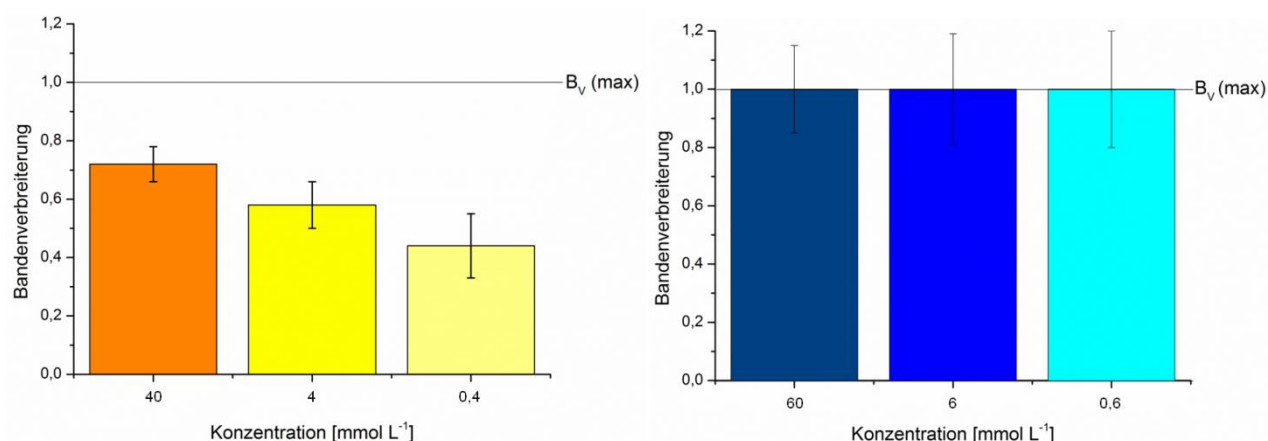


Abbildung 67: Bandenverbreiterung in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für applizierte Tartrazin- (links) und Methyleneblaulösung (rechts). Tartrazinlösung: 40, 4, 0,4 mmol L⁻¹, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Methyleneblaulösung: 60, 6, 0,6 mmol L⁻¹, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Laufmittel: deion. H₂O, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Papiersubstrat: 45 g m⁻² Eukalyptussulfatzellstoff. Die schwarze Linie symbolisiert den rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor.

Analyse der Laufzeiten der Proben

Die Fluidfront benötigte in den Messungen der Tartrazinproben im Mittel über alle drei Konzentrationen $126 \pm 5 \text{ s}$ und bei den Methyleneblauproben $135 \pm 9 \text{ s}$, um das Ende des Kanals zu erreichen. Vorausgesetzt die Konzentration der Analytlösung hatte, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Laufzeit, sollte die Standardabweichung über die Mittelwerte bei den verschiedenen Konzentrationen nicht größer sein als die maximale Standardabweichung einer Konzentration. Die maximale Standardabweichung einer Konzentration für Tartrazin wurde bei 40 mmol L⁻¹ mit 6 s und für Methyleneblau bei 60 mmol L⁻¹ mit 15 s beobachtet. Diese Werte waren größer als die beobachteten Standardabweichungen über alle Konzentrationen von 5 s für Tartrazin bzw. 9 s für Methyleneblau. Der Einfluss der Analytkonzentration auf die Laufzeit wurde folglich vernachlässigt (Details in Tabelle 21 in Abschnitt 9.6.4).

5.3. Retentionsverhalten von Tartrazin und Methyleneblau in Abhängigkeit des Substrats

Die Wechselwirkung zwischen Analyt und Fasernetzwerk spielt eine entscheidende Rolle bei dessen Retention (Abschnitt 3.2.2). Folglich könnte eine gezielte Variation des Substrats genutzt werden, um Kontrolle über die Retention von Analyten für gezielte Anwendungen zu gewinnen. Dazu mussten allerdings zunächst grundlegende Einflussparameter evaluiert werden. Nachdem Böhm *et al.* [26] bereits den Einfluss des Fasernetzwerks auf den Fluidtransport eingehend untersucht hatten, wurde im Folgenden dessen Einfluss auf die Retention der Modellfarbstoffe analysiert. Genauer betrachtet wurden dabei die Variation des Flächengewichts bzw. der Papierdichte und der Einfluss des Papiertyps (z.B. kommerzielles Filterpapier oder verschiedenen Fasertypen). Daraus sollen soweit möglich allgemeine Erkenntnisse zur Retention von Analyten in mikrostrukturierten Papieren erhalten werden.

Untersucht wurden photolithographisch mikrostrukturierte Papiere in horizontalen Systemen (Abschnitt 3.3.1). Um den Einfluss der fluiden Phase vernachlässigen zu können, wurde für alle Experimente als Fluid deionisiertes Wasser mit pH 7 und einer Leitfähigkeit von 25 mS cm^{-1} verwendet. Als Farbstofflösungen dienten entsprechend eingestellte Lösungen mit Konzentrationen von 4 mmol L^{-1} für Tartrazin und $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ für Methylenblau.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen der fluiden Phase konnte die Laufzeit der Proben bei den beschriebenen Variationen der soliden Phase nicht vernachlässigt werden. Eine Variation der Papierdichte änderte maßgeblich den Porenradius der untersuchten Proben und könnte so einen Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit bedingen (Abschnitt 4.4.2).^[33] Durch Variation des Fasertyps bzw. die Verwendung kommerzieller Papiere mit Additiven könnten Kontaktwinkel und Oberflächenspannung entscheidend beeinflusst werden. Diese Parameter nehmen, wie bereits von Böhm *et al.*^[26] und Songok *et al.*^[145] untersucht und beschrieben, über die Lucas-Washburn-Beziehung direkt Einfluss auf die in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Strecke bzw. bei konstanter Strecke auf die "Laufzeit" der Proben. Damit kann die Laufzeit beim Vergleich der verschiedenen Proben einer Messreihe nicht mehr als konstant angesehen werden. Allerdings sind die variierenden Laufzeiten intrinsische Eigenschaften des jeweiligen Substrats, dessen Eigenschaften untersucht werden sollten. Daher wurden die Experimente trotzdem unter beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Allerdings werden in den jeweiligen Abschnitten immer zuerst die beobachteten Laufzeiten diskutiert.

5.3.1. Einfluss der Papierdichte auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau

Das Flächengewicht eines Papiersubstrats hat nach Böhm *et al.*^[26] einen direkten Einfluss auf die Flussrate eines transportierten Fluids in einem mikrofluidischen System. Daher sollte in diesem Abschnitt der Einfluss des Flächengewichts bzw. der Papierdichte auf die Retention der Modellfarbstoffe untersucht werden. Das Flächengewicht steht über die Papierdicke in direktem Zusammenhang mit der Papierdichte (Gleichung 2). Da eine Variation des Flächengewichts praktisch besser zu realisieren war, wurde in den Experimenten das Flächengewicht der Papiere variiert (27, 45, 76, 84, 160 g m^{-2}). Anhand der gemessenen Papierdicken wurde daraus die Papierdichte berechnet (Abschnitt 4.4.1) und in der Auswertung als allgemeinere Größe aufgetragen. Alle anderen Parameter (pH-Wert, Leitfähigkeit, Farbstoffkonzentration und Fasertyp) wurden konstant gehalten (Details der Durchführung und Graustufenscans der Kanäle nach den Retentionsexperiment in Abschnitt 9.6.5).

Analyse der Laufzeiten der Proben

Abbildung 68 ist zu entnehmen, dass die Laufzeit die eine Wasserfront benötigte, um einen 5 cm langen und 0,4 cm breiten mikrostrukturierten Kanal vollständig zu passieren, abhängig von der Dichte des Papiersubstrats war. Tendenziell war eine Zunahme der Laufzeit mit zunehmender Dichte festzustellen. Im Rahmen der Fehler war kein Unterschied in der Laufzeit für Tartrazin- und Methylenblauprobe zu beobachten.

Der beschriebene Trend war anhand des Lucas-Washburn-Modells unter Einbeziehung der gemessenen Porenradien bei verschiedenen Papierdichten für Eukalyptussulfatpapier zu erwarten. Quecksilberporosimetriemessungen (Abschnitt 4.4.2) bestätigten eine Abnahme des Porenradius mit steigender Papierdichte. Nach Lucas-Washburn war der Porenradius proportional zur von der Fluidfront zurückgelegten Strecke. Eine Abnahme des Porenradiuses führte folglich im gleichen Zeitfenster zu einer kürzeren zurückgelegten Strecke, bzw. es wurde mehr Zeit benötigt, eine

Strecke der gleichen Länge zurückzulegen. Diese Zunahme der Laufzeit mit der Papierdichte konnte beobachtet werden.

Bereits Böhm *et al.*^[26] beschrieben eine Zunahme der Flussrate eines kapillarkraftgetriebenen Flüssigkeitsstrom in einem mikrostrukturierten Papiersubstrat mit abnehmendem Flächengewicht. Dies deckt sich mit den beschriebenen Beobachtungen. Die Absolutwerte der Messergebnisse und Literaturdaten lassen sich nicht vergleichen, da es sich um Papiere verschiedener Fasertypen (Eukalyptussulfat und Baumwolllinters) handelt. Für eine detaillierte Überprüfung der Ergebnisse anhand einer Lucas-Washburn-Kinetik wurden in diesem Experiment mit anderem Schwerpunkt ("Untersuchung der Retention") zu wenig Datenpunkte erfasst.

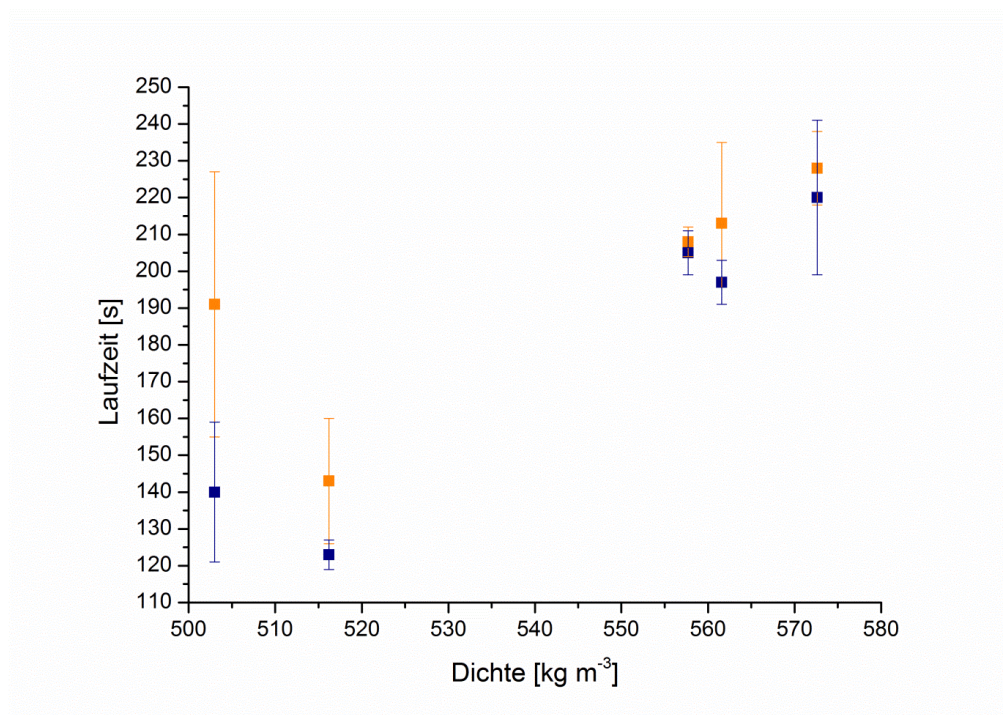


Abbildung 68: Laufzeit eines 5 cm langen und 0,4 cm breiten Papierkanals als Funktion der Papierdichte des Substrates. Laufmittel: deion. H₂O, pH 7, 25 mS cm⁻¹. Kanäle mit applizierter Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau).

Retentionsfaktor und Bandenverbreiterung von Tartrazin und Methylenblau

Ein Einfluss der Papierdichte auf den Retentionsfaktor war nicht eindeutig nachzuweisen (Abbildung 69). Zwar war ein leichter Abfall des R_f -Wertes mit zunehmender Papierdichte zu vermuten, allerdings war dieser Trend nicht signifikant. Dennoch lassen sich Erklärungsansätze für diesen Trend finden. Es könnte angenommen werden, dass aufgrund der längeren Laufzeit bei höherer Papierdichte bedingt durch abnehmende Porenradien (Abschnitt 4.4.2), mehr Möglichkeit zur Wechselwirkung der Farbstoffe mit den Papierfasern besteht. Dies könnte zu vermehrter Retention führen.

Des Weiteren könnte angenommen werden, dass dichteres Papier den Farbstoffmolekülen mehr Oberfläche und damit mehr Adsorptionsplätze präsentiert. Auch dies könnte eine Begründung für die zunehmende Retention darstellen. Diese Hypothese sollte anhand von Porositätsdaten aus Quecksilberporosimetriemessungen bestätigt werden. Allerdings lieferte die Messung keine brauchbaren Ergebnisse (Abschnitt 4.4.2), sodass die Hypothese nicht bestätigt werden konnte.

Auf die Bandenverbreiterung war im Rahmen der Fehler kein signifikanter Einfluss der Papierdichte weder für Methylenblau noch für Tartrazin zu beobachten (Abbildung 70).

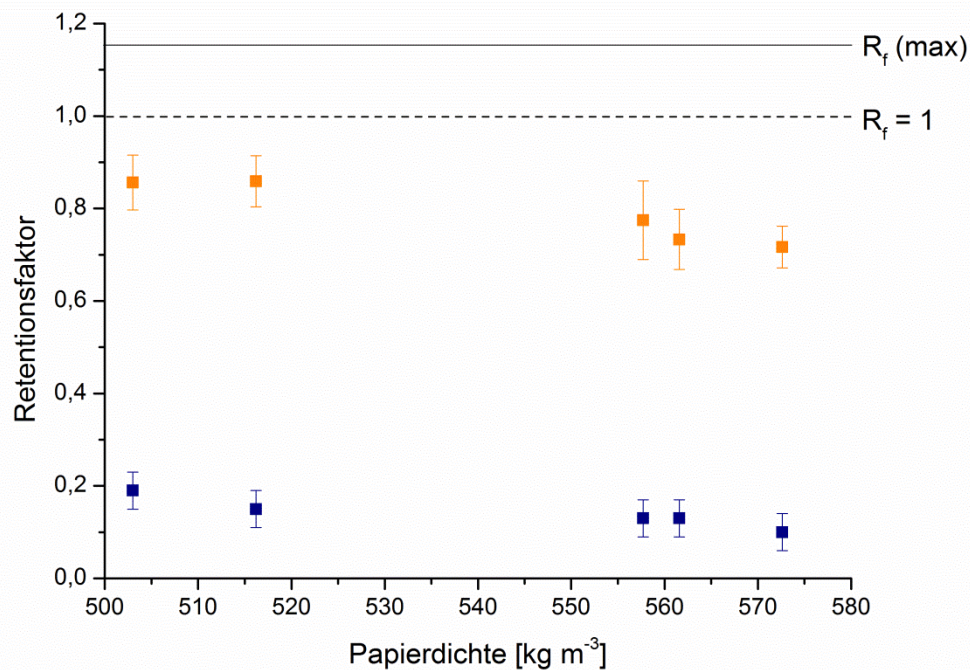


Abbildung 69: Retentionsfaktor in Abhängigkeit der Papierdichte für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylenblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Laufmittel: deion. H_2O , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$. Die schwarze Linie symbolisiert den rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor. Die gestrichelte Linie markiert den üblicherweise maximalen Retentionsfaktor bei 1.

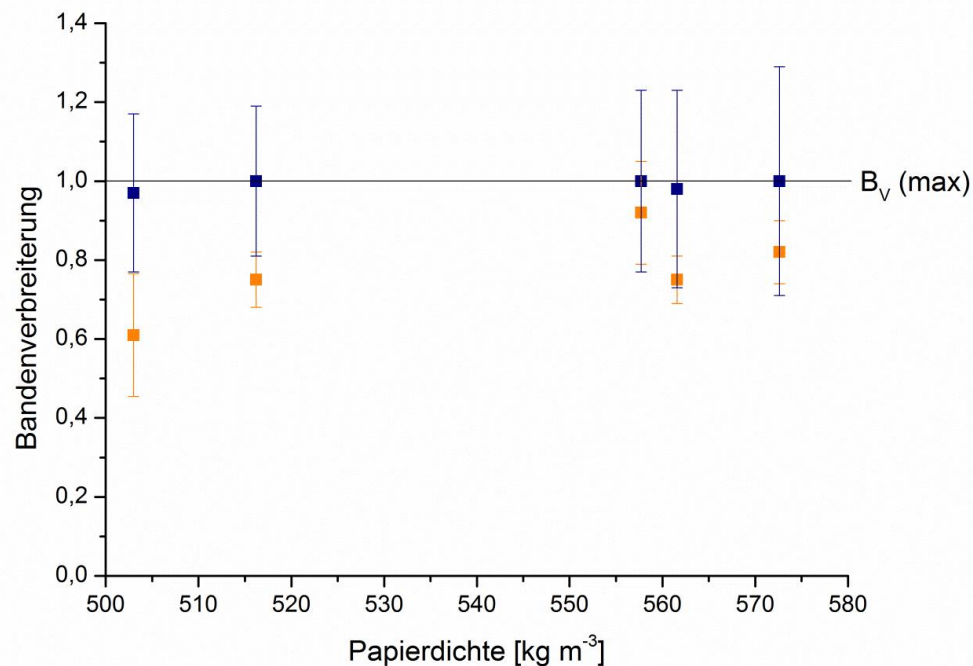


Abbildung 70: Bandenverbreiterung in Abhängigkeit der Papierdichte für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylenblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Laufmittel: deion. H_2O , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$. Die schwarze Linie symbolisiert die rechnerisch maximal mögliche Bandenverbreiterung.

5.3.2. Einfluss des Papiertyps auf die Retention von Tartrazin und Methylenblau

Der Fasertyp bzw. zugefügte Additive haben einen direkten Einfluss auf das Zetapotential der Cellulosefasern (Abschnitt 4.3). Wie bereits bei der Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die Farbstoffretention festgestellt (Abschnitt 5.2.1), war die Faserladung maßgeblich für die Retention der Farbstoffe verantwortlich. Folglich erschien es sinnvoll, den Einfluss der Fasertypen bzw. zugesetzter Additive auf die Farbstoffretention zu untersuchen. Untersucht wurden handgebildete Papiere mit einem Flächengewicht von 84 g m^{-2} aus Eukalyptussulfatfasern und Baumwolllinters sowie kommerziell erhältliches Filterpapier 15A von Roth.

Analyse der Laufzeiten der Proben

Abbildung 71 zeigt deutlich, dass die Laufzeiten der Proben stark vom Papiertyp abhängen. Für die gleiche Strecke von 5 cm bei gleichem Flächengewicht benötigte eine Fluid der beschriebenen Zusammensetzung in Roth 15A Filterpapier fast doppelt so lange wie in Baumwolllinterspapier und fast sechsmal so lange wie in Papier aus Eukalyptussulfatfasern.

Diese Beobachtung war mit Hilfe der Lucas-Washburn-Beziehung bzw. der Variante nach Camplisson *et al.*^[91] zu erklären. Eine Änderung des Fasertyps bzw. die Verwendung von kommerziellen Papieren mit Additiven änderte potentiell den Kontaktwinkel und die Oberflächenspannung einer Papierprobe. Dies konnte maßgeblich die Laufzeit der Proben beeinflussen. Auch Böhm *et al.*^[26] und Lappalainen *et al.*^[8] beobachteten bereits einen Einfluss des Fasertyps auf die Fließrate eines mikrostrukturierten Kanals. Sie erklärten diese Beobachtung anhand der Unterschiede der Oberflächenchemie der Fasern bedingt durch einen anderen Anteil an Lignin und Hemicellulose sowie andere chemische Gruppen an der Faseroberfläche durch den Aufschlussprozesse.

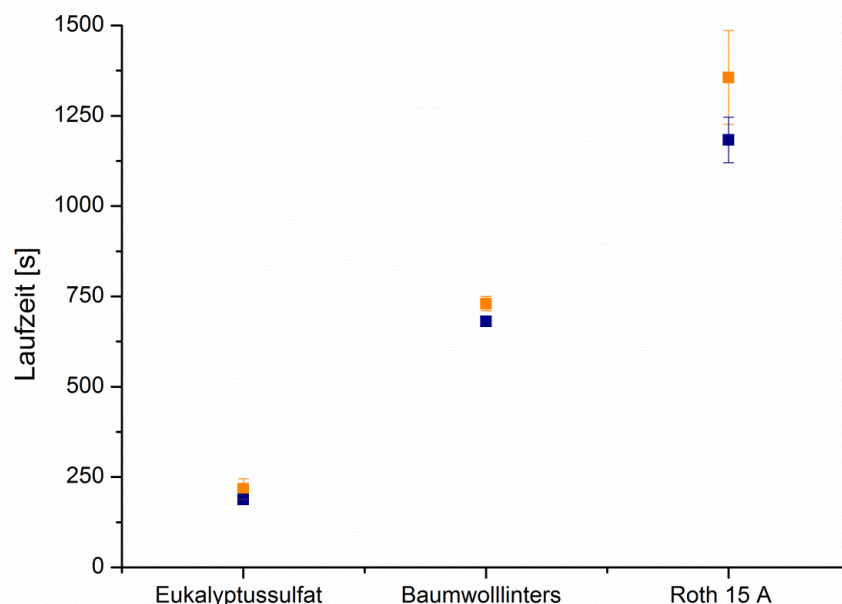


Abbildung 71: Laufzeit eines 5 cm langen und 0,4 cm breiten Papierkanals für verschiedene Papiersorten des gleichen Flächengewichts (84 g m^{-2}). Laufmittel: deion H_2O , pH 7, 25 mS cm^{-1} . Für Kanäle mit applizierter Tartrazin- (orange) und Methylenblaulösung (blau).

Retentionsfaktor und Bandenverbreiterung von Tartrazin und Methylenblau

Die Retention von Tartrazin war in Baumwolllinterpapieren etwas aber nicht signifikant stärker als in Eukalyptussulfatpapieren. Die Retention von Tartrazin in nassfestmittelenthaltendem Roth 15A Filterpapier war hingegen deutlich stärker als in Papieren ohne Additive (Abbildung 73). Die Bandenverbreiterung von Tartrazin verhielt sich äquivalent. Mittlere sehr ähnliche Bandenbreiten für handgebildete Papiere stehen einer im Verhältnis deutlich höheren Bandenverbreiterung für kommerzielles Filterpapier entgegen (Abbildung 74).

Zwei Erklärungsansätze lassen sich für das beschriebene Verhalten finden. Einerseits könnte die deutlich erhöhte Laufzeit der Filterpapierprobe die verstärkte Retention begründen. Ein verlangsamter Fluidtransport und damit auch verlangsamter Transport der Farbstoffmoleküle im Fasernetzwerk bietet verstärkt Möglichkeit für Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle mit den Fasern. Häufigere Adsorption könnte den Grund für die erhöhte Retention darstellen. Andererseits könnte die erhöhte Retention und Bandenverbreiterung mit den im Roth Filterpapier enthaltenen Nassfestmitteln zusammenhängen. Bereits Su *et al.*^[86] beschrieben eine Wechselwirkung positiv geladener Nassfestmitteln mit negativ geladenen DNA-Aptamere. Die in Roth 15A enthaltenen positiv geladenen Polyamidoamin-Epichlorhydrin-Harze könnten trotz eines insgesamt negativen Zetapotentials des Papiers gezielt Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Farbstoffmolekülen eingehen und so für eine erhöhte Retention und Bandenverbreiterung der Tartrazinmoleküle sorgen (Abbildung 72).

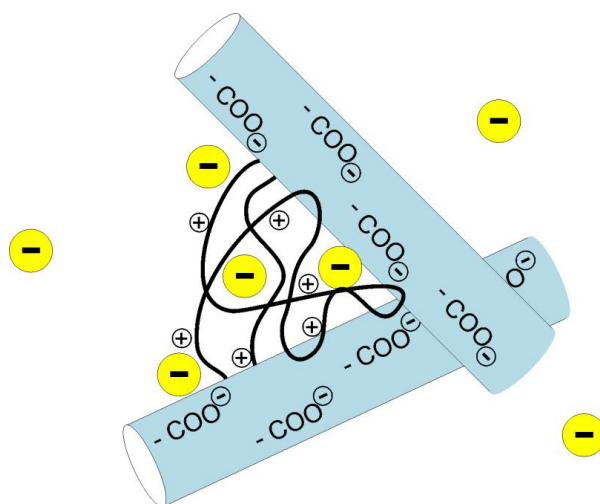


Abbildung 72: Negativ geladene Tartrazinmoleküle (gelb) werden an positiv geladenen Nassfestmittelmolekülen (Polyamidoamin-Epichlorhydrin-Harze) verstärkt reterniert, während sie durch den mikrofluidischen Fluss an den negativ geladenen Cellulosefasern (blau) vorbeitransportiert werden.

Methylenblaumoleküle zeigten unabhängig von der Papierart einen geringen Retentionsfaktor in einem ähnlichen Wertebereich. Unter der Annahme einer hauptsächlich ladungsbasierten Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle mit den Cellulosefasern, war dieses Verhalten zu erwarten. Die Ladung der Fasern bei verschiedenen pH-Werten wurde mittels Zetapotentialmessungen bestimmt (Abschnitt 4.3). Bei neutralem pH-Wert ließ sich für alle Faserstoffe ein negatives Zetapotential messen (Eukalyptussulfat: $-17,2 \pm 1,5$ mV; Baumwolllinter: ca. $-12,7 \pm 0,8$ mV; Roth 15A: ca. $-3,9 \pm 0,4$ mV). Eine starke Retention des positiv geladenen Farbstoffes lag folglich nahe. Die Stärke der Ladung schien hier keinen Einfluss auf die Retention zu haben. Auch die für alle drei Papiersorten maximale Bandenverbreiterung (Abbildung 74) unterstützte diesen Erklärungsansatz.

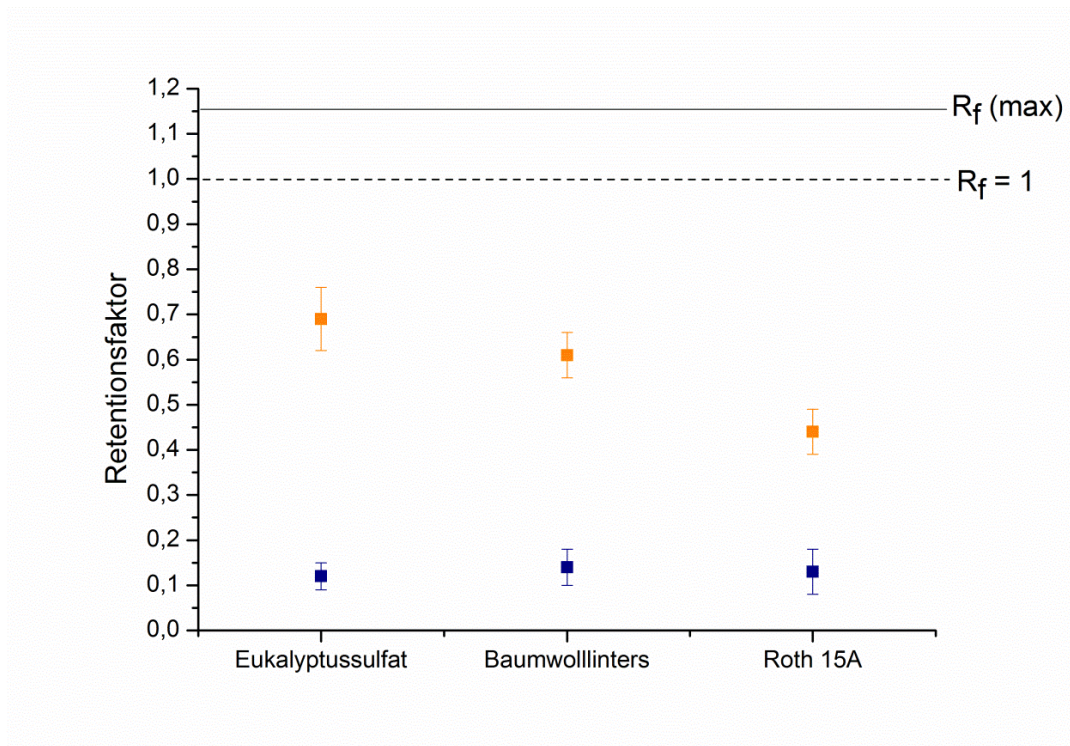


Abbildung 73: Retentionsfaktor auf verschiedenen Papiersubstraten für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Laufmittel: deion. H_2O , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Flächengewicht: 84 g m^{-2} . Die schwarze Linie symbolisiert den rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor. Die gestrichelte Linie markiert den üblicherweise maximalen Retentionsfaktor bei 1.

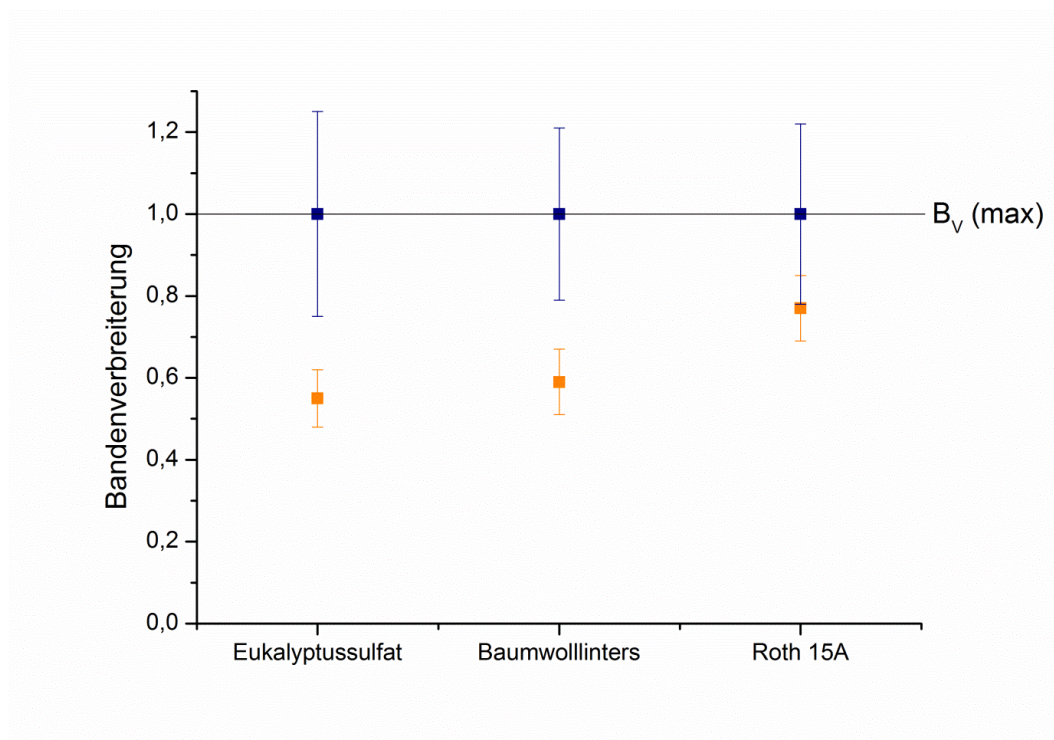


Abbildung 74: Bandenverbreiterung auf verschiedenen Papiersubstraten für applizierte Tartrazin- (orange) und Methylblaulösung (blau). Tartrazinlösung: 4 mmol L^{-1} , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Methylblaulösung: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Laufmittel: deion. H_2O , pH 7, $\chi = 25 \text{ mS cm}^{-1}$; Flächengewicht: 84 g m^{-2} . Die schwarze Linie symbolisiert die rechnerisch maximal mögliche Bandenverbreiterung.

5.4. Fazit

Die ersten beiden Abschnitte der Doktorarbeit verfolgten das Ziel, ein besseres Verständnis der Retention der Modellanalyten (Tartrazin und Methylenblau) in Papier zu erarbeiten. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung der Farbstoffe mit dem Substratmaterial Papier unter verschiedenen Bedingungen konnten eine Reihe neuer Erkenntnisse gewonnen werden:

- **Tartrazin** weist allgemein eine relativ geringe Retention auf, die bei einem hohen pH-Wert und einer geringen Leitfähigkeit in Eukalyptussulfatpapier minimal ist.
- Die Retention von **Methylenblau** ist deutlich höher als bei Tartrazin. pH-Wert und Leitfähigkeit scheinen kaum einen Einfluss auf deren Stärke zu haben.
- Für **beide Farbstoffe** konnte festgestellt werden, dass die Papierdichte keinen signifikanten Einfluss auf die Retention hat. Der Papiertyp hingegen beeinflusst das Retentionsverhalten von Tartrazin, nicht aber das von Methylenblau.

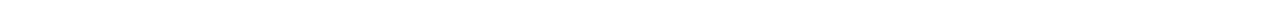
Diese Ergebnisse bieten einen guten Ansatzpunkt für eine Erweiterung des Verständnisses der während der Retention eines Farbstoffes in Papier ablaufenden Prozesse. Garnier *et al.*^[6] definierten allgemein drei Einflussgrößen auf die Wechselwirkung von Analyten mit einem Papiersubstrat: Größenausschluss, selektive Adsorption/Chromatographie und Ionenaustausch (ionische Wechselwirkung).

Der **Größenausschluss** (Abschnitt 3.2.1) als Einflussgröße konnte im untersuchten System vernachlässigt werden, da bei einem durchschnittlichen Porendurchmesser von $11\ \mu\text{m}$ gegen eine Molekülgröße von $1 \cdot 0,5\ \text{nm}$ ^[106] für Methylenblau bzw. einer Länge von $1,8\ \text{nm}$ ^[101] für Tartrazin davon ausgegangen werden konnte, dass sich die Farbmoleküle frei in den Poren bewegen können. Relevanter erschien stattdessen der Aspekt der **selektiven Adsorption/Chromatographie**. Das beschriebene System schien auf den ersten Blick eine gute Vergleichbarkeit mit der **Papierchromatographie** (Abschnitt 3.2.1) aufzuweisen. Offensichtlich wurde ein Fluid durch ein Papiersubstrat transportiert, wobei eine Trennung der Analyten beobachtet werden konnte. Bei einer näheren Betrachtung fiel allerdings auf, dass es sich bei der Papierchromatographie um eine Verteilungschromatographie handelt, bei der das Fluid meist ein organisches, nicht mit Wasser mischbares Lösungsmittel ist. So bilden sich zwei Phasen zwischen dem wasserfeuchten Substrat und der organischen Phase aus, zwischen denen sich die Analyte, abhängig von ihrer Affinität verteilen und aufgrund der Verweilzeit im jeweiligen System auftrennen. Da in den beschriebenen Experimenten keine organischen Lösungsmittel zum Einsatz kamen, konnte die Verteilungschromatographie als Modell ausgeschlossen werden. Zur Beschreibung der Experimente eignete sich das Modell der **Adsorptionschromatographie** (Abschnitt 3.2.1). Analyte in der mobilen Phase wechselwirken physikalisch mit Cellulosefasern. Komponentenspezifische Adsorptions- und Desorptionsprozesse führen zu unterschiedlich starker Retention der Analytmoleküle. Diese Erkenntnis wurde besonders durch die Ergebnisse der Experimente zur Untersuchung des Einflusses der Farbstoffkonzentration auf die Retention unterstützt. Eine erhöhte Konzentration resultierte in einem erhöhten R_F -Wert. Aus Sicht des Modells der Adsorptionschromatographie bedeutete eine erhöhte Farbstoffkonzentration eine erhöhte Anzahl an Analytmolekülen auf die gleiche Anzahl an Adsorptionsplätzen. Folglich wurde keine geringere Retention, sondern eine klassische Überladung des Adsorptionsmaterials beobachtet. Dies resultierte makroskopisch in einem erhöhten R_F -Wert.

Die Übergänge zwischen den verschiedenen Aspekten der Retention sind fließend. Die Ergebnisse wiesen jedoch darauf hin, dass der Ionenaustausch, der auch als ein besonderer Aspekt der Adsorption angesehen werden kann, den größten Einfluss auf die Wechselwirkung der

Farbstoffmoleküle mit dem Papiersubstrat hat. **Elektrostatische Wechselwirkungen** erklärten die starke Retention von positiv geladenen Methylenblaumolekülen an negativ geladenen Cellulosefasern (nahezu) unabhängig von einer Variation der fluiden oder soliden Phase. Die negativ geladenen Tartrazinmoleküle reternieren im Gegensatz deutlich schwächer, sodass auch andere Adsorptionsprozesse zum Tragen kommen könnten. Dennoch war die leichte Abnahme der Retention von Methylenblau und die Zunahme von Tartrazin bei steigender Leitfähigkeit vermutlich ladungsbasiert zu erklären (Abschnitt 5.2.1). Während ein hoher Anteil positiver Ionen im Fluid in der Adsorption mit Methylenblaumolekülen konkurrierten, ermöglichten diese wiederum durch die Ausbildung einer intermediären, positiven Schicht eine bessere Adsorption negativ geladener Farbstoffmoleküle an die ebenfalls negativen Cellulosefasern.

Die beschriebenen Ergebnisse wurden genutzt, um die Spezifität von μ PADs zu erhöhen. Ein Farbstoffgemisch von positiv geladenen Methylenblaumolekülen und negativ geladenen Tartrazinmolekülen konnte durch einfache Wechselwirkung mit den negativ geladenen Cellulosefasern aufgetrennt werden. Durch die Einstellung einer möglichst geringen Leitfähigkeit der fluiden Phase wurde diese **Separation des Farbstoffgemischs** optimiert (Abschnitt 5.2.2). Die Auftrennung des Analytgemisches ermöglichte eine spezifische Analyse der Einzelkomponenten und erhöhte so die Spezifität des μ PADs.



6. Gezielte, ortsspezifische Retention der Modellkomponente Tartrazin in mikrostrukturiertem Papier

Die Ergebnisse der Untersuchung der Retention verschieden geladener Modellkomponenten im negativ geladenen Papierfasernetzwerk in Kapitel 5 machen deutlich, dass elektrostatische Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle in der Wechselwirkung von Substrat und Analyt spielen. Dieses Prinzip wurde bereits zur Stoffauftrennung zur Erhöhung der Spezifität von papierbasierten mikrofluidischen Systemen (μ PADs) genutzt (Abschnitt 5.2.2). In diesem Kapitel soll es darüber hinaus verwendet werden, um die Sensitivität von μ PADs zu verbessern. Negativ geladene Farbstoffmoleküle werden im negativ geladenen Papierfasernetzwerk kapillarkraftgetrieben transportiert (Kapitel 5). Durch ortsspezifisches Einbringen positiver Ladung in definierten Bereichen der mikrofluidischen Kanäle, im Folgenden als "Patch" bezeichnet, soll der negativ geladene Modellfarbstoff gezielt reterniert werden. Die auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen eingebrachter positiver Ladung und negativer Ladung der Farbstoffmoleküle basierende Retention sorgt für eine lokale Konzentrationserhöhung der Moleküle im Patchbereich, sodass auch Farbstoffe in vorher nicht sichtbaren Konzentrationen detektiert werden können (Abbildung 75).

Im Folgenden wird zunächst beschrieben, wie die positive Ladung in den Kanälen generiert wird (Abschnitt 6.1), bevor die Wechselwirkung von Tartrazin mit den eingebrachten Patches in verschiedenen Experimenten beschrieben wird (Abschnitt 6.2 und 6.3). In diesem Kapitel präsentierte Ergebnisse sind teilweise bei Wendenburg *et al.*^[132] bereits veröffentlicht.

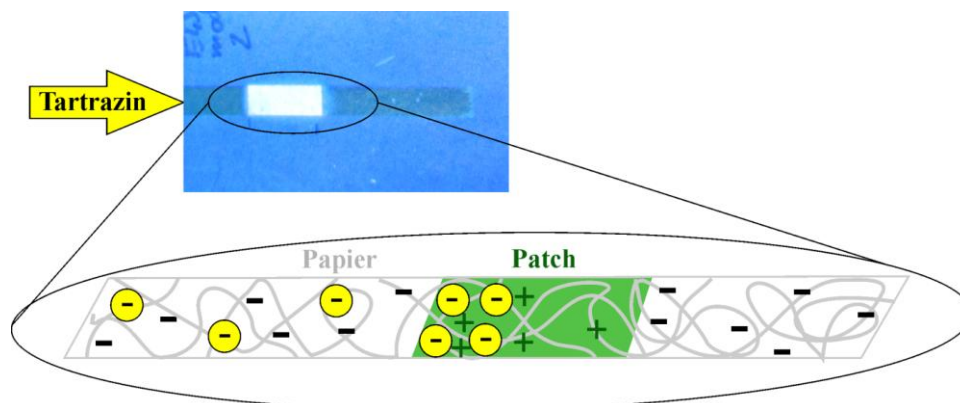


Abbildung 75: Schematische Darstellung der Farbstoffretention durch ortsspezifische Modifikation der Papieroberfläche. Der negativ geladene Modellfarbstoff Tartrazin wird kapillarkraftgetrieben durch das negativ geladene Cellulosefasernetzwerk transportiert. Sobald er den positiv geladenen Patchbereich erreicht, führen attraktive Wechselwirkungen zu einer Fixierung der Farbstoffmoleküle in diesem Bereich. Fotografie: Kanal mit nachträglich modifiziertem Polymerpatch nach einem Retentionsexperiment unter UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Die Fluoreszenz liegt in der Copolymerisation mit bei dieser Wellenlänge fluoreszierendem Pyrenmonomer begründet.^[132]

6.1. Generierung positiver Ladungen durch polymeranalogue Umsetzung (PU)

Die Photolithographie mittels photoreaktiver Polymere nach Böhm *et al.*^[21] ist derzeit die einzige bekannte Mikrostrukturierungsmethode für Papiersubstrate, die es ermöglicht beliebige Funktionalitäten ortsspezifisch und kovalent in μ PADs einzubringen (Abschnitt 1.1). Um mit dieser Methode positive Ladungen ortsspezifisch in μ PADs einzubringen, musste zunächst ein Copolymer, aus einem positiv geladenen Monomer als Hauptkomponente und einem geringen Anteil an benzophenonhaltigem Monomere ($<2,5 \text{ mol-\%}$) synthetisiert werden. In Vorexperimenten (Bachelorthesis David Punal-Gamboa^[146]) scheiterte eine freie radikalische Polymerisation

verschiedener positiv geladener Monomer mit den benzophenonhaltigen Monomeren 4-Methylacryloyloxybenzophenon (MABP) und Phenyl-(4-(2-vinyloxy)ethoxyphenyl)methanon (VEBP)^[147]. Daher wurde eine alternative Vorgehensweise gewählt. Böhm^[24] publizierte in seiner Dissertationsschrift die Synthese des Copolymers P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) aus vier verschiedenen Monomeren (Abbildung 76). Als hydrophile Matrix besteht dieses Polymer hauptsächlich aus *N,N*-Dimethylacrylamid (DMAA). Darüber hinaus sind in geringen Anteilen MABP als benzophenonhaltiges Monomer zur photolithographischen Anbindung und 1-Pyrenemethyl methacrylat (PyMA) als Fluoreszenzmarker copolymerisiert. Die vierte Einheit (ca. 15 mol-%) repräsentiert das Monomer *N*-Methacryloyl- β -alanin (MAC₂AE). Dieses Monomer enthält einen reaktiven *N*-Hydroxy-Succinimid-Ester, der bevorzugt mit primären Aminen reagiert.^[24] An diese Funktion sollte nun in einer polymeranalogen Umsetzung über ein primäres Amin eine permanente positive Ladung in das Polymer eingebracht werden (Abbildung 77). Dafür eignete sich (2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid (AEMAC).

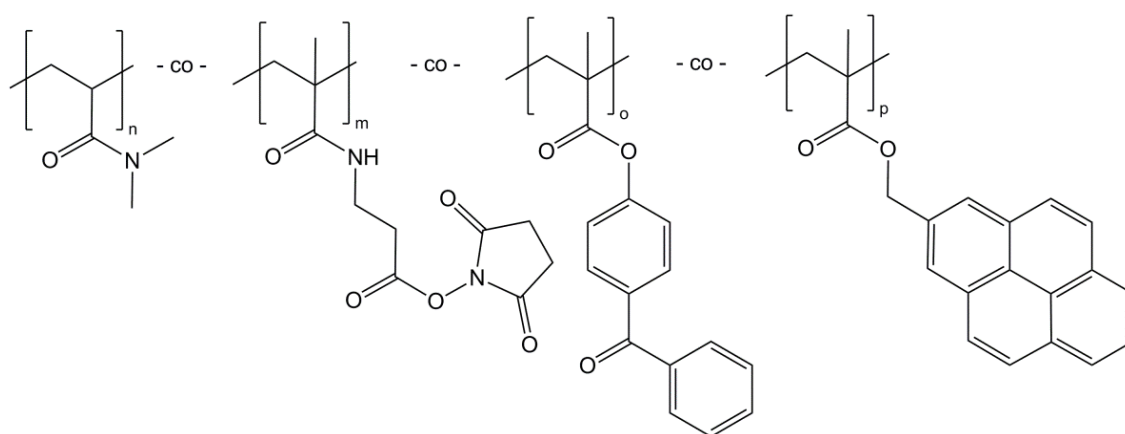


Abbildung 76: Chemische Struktur von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA).^[132]

6.1.1. Polymeranaloge Umsetzung (PU) in Lösung

Die polymeranaloge Umsetzung von (2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid (AEMAC) mit dem *N*-Hydroxy-Succinimid-Ester in P(DMAA_{0,8}-co-MAC₂AE_{0,15}-co-MABP_{0,04}-co-PyMA_{0,01}) wurde zunächst in Lösung untersucht (Abbildung 77). Nach Pérez-Perrino *et al.*^[148] und Hermanson^[149] katalysiert Triethylamin (TEA) als "Hilfsbase" die Aminolyse. Daher wurde eine leicht basische, methanolische Lösung beider Komponenten für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Produkt P(DMAA-co-AEMAC-co-MABP-co-PyMA) durch Ausfällen und Dialyse aufgereinigt. Das abgespaltene *N*-Hydroxysuccinimid wurde dabei aus dem Produkt entfernt (Details der Durchführung in Abschnitt 9.3.5). Die Reaktion wurde mittels FTIR-, ¹H- sowie ¹³C-NMR-Spektroskopie durch Vergleich mit nicht umgesetztem Polymer nachgewiesen.

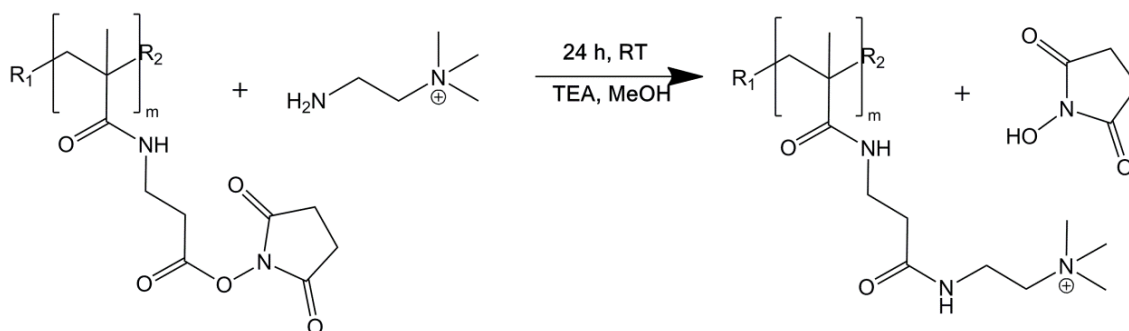


Abbildung 77: Polymeranaloge Umsetzung von P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) zu P(DMAA-*co*-AEMAC-*co*-MABP-*co*-PyMA). Mittels AEMAC wird eine positive Ladung in das Polymer eingebracht.^[132]

FTIR-Spektroskopie

In Abbildung 78 sind die FT-IR-Spektren von P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) und P(DMAA-*co*-AEMEC-*co*-MABP-*co*-PyMA) vergleichend aufgetragen. Im Folgenden wurden ausschließlich die für die Reaktion relevanten Signale diskutiert (Zuordnung aller Signale in Tabelle 7). Im Vergleich der Spektren des Polymers vor und nach der PU fiel eine starke Übereinstimmung abgesehen von Signalen im Bereich 1650–1900 cm⁻¹ auf. Die drei Signale bei einer Wellenlänge von 1813 cm⁻¹, 1782 cm⁻¹ und 1738 cm⁻¹ wurden im Spektrum vor der PU in P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) detektiert. Nach der PU in P(DMAA-*co*-AEMEC-*co*-MABP-*co*-PyMA) konnten diese Signale nicht mehr oder nur noch sehr schwach detektiert werden. In Übereinstimmung mit Literaturangaben^[150] konnten diese Schwingungen dem reagierenden *N*-Hydroxy-Succinimid-Ester (NHS) zugeordnet werden. Da die MAC₂AE-Einheit nur ca. 15 mol-% des Polymers ausmachen, waren die Signale verhältnismäßig schwach ausgeprägt.

Die beschriebenen Ergebnisse belegten eindeutig, dass der NHS-Ester in der PU abreagierte. Allerdings ließ sich anhand des FTIR-Spektrums nicht eindeutig feststellen, ob die PU spezifisch mit den primären Aminen des beigefügten AEMAC abläuft. Es könnte auch lediglich eine Hydrolyse stattgefunden haben. Eindeutig ließe sich die Aminolyse ausschließlich anhand von neuen Signalen für die eingebrachte quartäre Ammoniumgruppe (CH₃)₃N⁺ im Produktspektrum detektieren. In der Literatur^[151] werden dieser Gruppe Streck- und Deformationsschwingungen der Methylgruppen bei 3100–3020 cm⁻¹ und 1485 cm⁻¹ zugeordnet. Diese Signale wurde allerdings im vorliegenden Spektrum durch die im Polymer ohnehin enthaltenen Methylgruppen überlagert. Lediglich die Schulter des Signals bei 3454 cm⁻¹ im Spektrum von P(DMAA-*co*-AEMEC-*co*-MABP-*co*-PyMA) könnte möglicherweise auf diese Gruppe zurückgeführt werden. Als charakteristische Schwingungen für die gesamte (CH₃)₃N⁺-Gruppe sind nur die antisymmetrische und symmetrische Streckschwingung bei 950 und 750 cm⁻¹ Literatur bekannt.^[151] Da diese Signale im Fingerprintbereich liegen, wäre eine Zuordnung schwierig und nicht aussagekräftig.

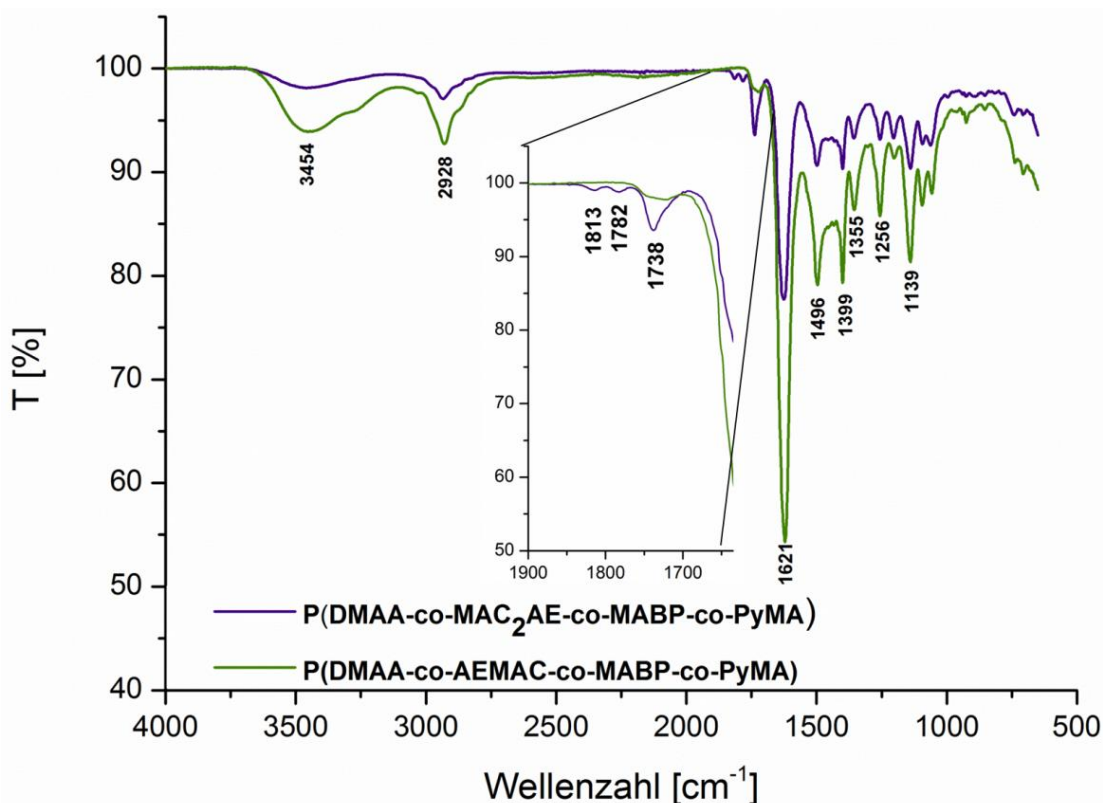


Abbildung 78: FTIR-Spektren des funktionalen, photoreaktiven Polymers vor (in Violett) und nach (in Grün) der polymeranalogen Umsetzung.

Tabelle 7: Zuordnung der FTIR-Signale der Polymere P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) und P(DMAA-co-AEMEC-co-MABP-co-PyMA). Im Vergleich gemessene Wellenlängen λ und Literaturangaben.

λ (gemessen) cm^{-1}	λ (Literatur) cm^{-1}	Zugeordnete Schwingung
3454	3460–3400 ^[138] 3500 ^[150a]	N-H Streckschwingung in N-monosubstituiertem Amin OH Streckschwingung von mit NHS assoziiertem Wasser
2928	2960–2850 ^[138]	C-H Streckschwingung
1813	1812 ^[150b]	NHS spezifische Schwingung
1782	1786 ^[150b]	NHS spezifische Schwingung
1738	1722 ^[150a] 1750–1735 ^[138]	C=O Schwingung im Imid des NHS' C=O Schwingung in Estern
1621	1618 ^[152] , 1630 ^[153] , 1640 ^[154]	C=O Streckschwingung (Amid I)
1496	1494 ^[154] , 1495 ^[152]	CH ₃ (asymmetrische) Deformationsschwingung
1399	1404 ^[152]	N-H Deformationsschwingung (Amid II)
1355	1354 ^[152]	CH ₃ Deformationsschwingung
1256	1249 ^[155]	C-N Schwingung in DMAA
1139	1139 ^[155]	C-N Schwingung in DMAA

NMR-Spektroskopie

Das ¹H-Spektrum ließ darauf schließen, dass eine Umsetzung stattgefunden hat. Das Signal bei 3,56 ppm im Spektrum von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA), das die beiden Wasserstoffatome an C2 repräsentiert, wurde im Spektrum nach der Umsetzung von zwei Signalen bei 3,36 und 3,79 ppm überlagert. Zur Zuordnung dieser Signale wurde unterstützend das HSQC-

Spektrum von P(DMAA-*co*-AEMEC-*co*-MABP-*co*-PyMA) (siehe Anhang) herangezogen. Anhand dessen ließ sich das Signal bei 3,36 ppm den Methylgruppen des quartären Amins zuordnen. Das Signal bei 3,79 ppm wurde den Wasserstoffatomen an C2, C4 und C5 zugeordnet. Eine Quantifizierung der Umsetzung mittels der Signalintensitäten war aufgrund von Signalüberlagerung in Produkt und Edukt schwierig. Folglich konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Umsetzung quantitativ erfolgte. Weitere Signale die im ^1H -Spektrum des Edukts und Produkts gleichermaßen auftraten, sind in Tabelle 8 zugeordnet.

Tabelle 8: Zuordnung der Signale im ^1H -Spektrum von Edukt und Produkt der polymeranalogen Umsetzung (Abbildung 79).

Signal [ppm]	Zuordnung in P(DMAA- <i>co</i> -MAC ₂ AE- <i>co</i> -MABP- <i>co</i> -PyMA)	Zuordnung in P(DMAA- <i>co</i> -AEMAC- <i>co</i> -MABP- <i>co</i> -PyMA)
0,73–1,99	Methyl- und Methylengruppen Polymerrückgrat	Methyl- und Methylengruppen Polymerrückgrat
2,20–3,21	Methylgruppen DMAA H an C3	Methylgruppe DMAA H an C3 und C8
3,36	-	H an C10
3,56	H an C2	-
3,79	-	H an C2, C4, C5
7,26–7,88	Aromatische H-Atome MABP Lösungsmittelsignal	Aromatische H-Atome MABP Lösungsmittelsignal
7,97–8,26	Aromatische H-Atome PyMA	Aromatische H-Atome PyMA

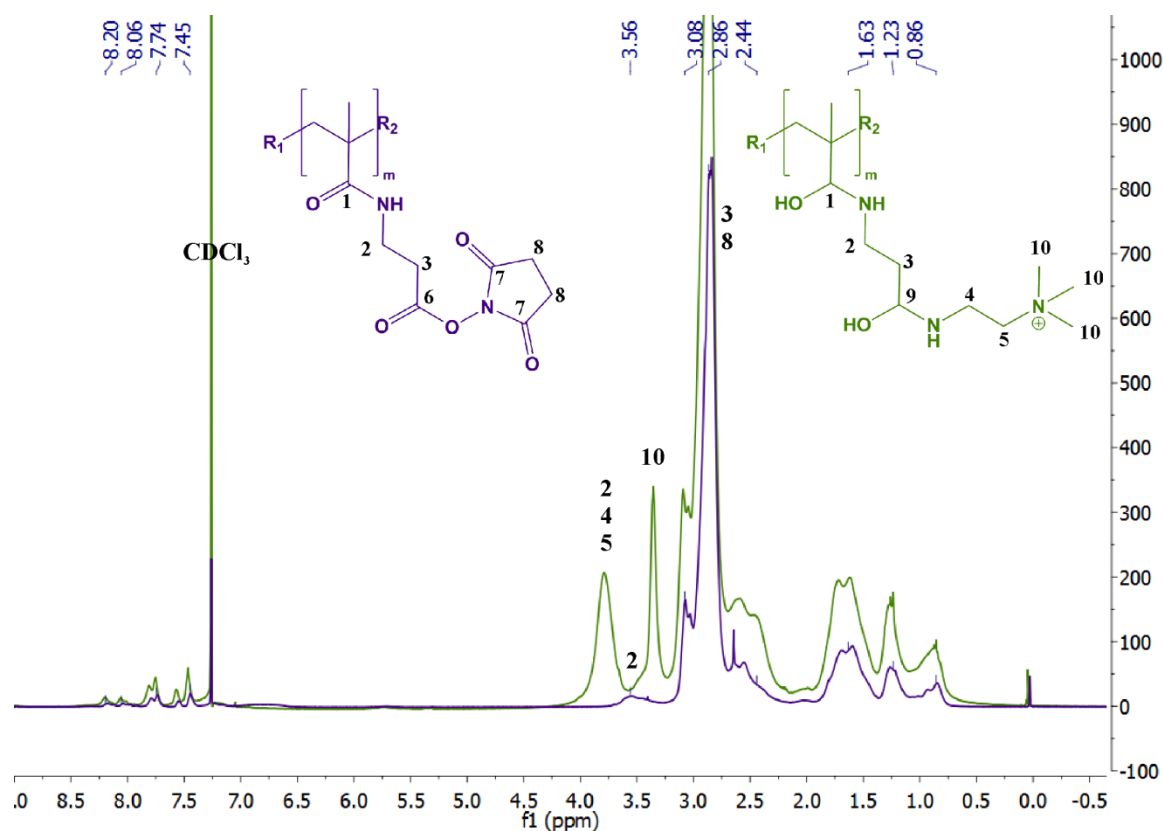


Abbildung 79: ^1H -NMR von P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) (in Violett) und P(DMAA-*co*-AEMAC-*co*-MABP-*co*-PyMA) (in Grün) in CDCl_3 bei 500 Hz im Vergleich. Zuordnung der Signale erfolgt in Tabelle 8.^[132]

Die Ergebnisse der ^{13}C -NMR-Spektroskopie (Abbildung 80) bestätigten die Hinweise aus der FTIR- und ^1H -Spektroskopie. Die Methylengruppen des Succinimids C8 bei 25,8 ppm sowie die Signale der Carbonylkohlenstoffe C6 und C7 bei 167,4 ppm und 169,5 ppm wurden ausschließlich im Edukt P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) detektiert. Dies wies erneut auf eine Reaktion des NHS-Esters hin. Das ^{13}C -NMR-Spektrum lieferte darüber hinaus auch den endgültigen Beweis dafür, dass es sich bei dieser Reaktion um eine Aminolyse und keine Hydrolyse handelte. Das Signal der Methylgruppen im quartären Amin C10 bei 53,8 ppm konnte ausschließlich nach einer erfolgreichen polymeranalogen Umsetzung detektiert werden, die damit nachgewiesen werden konnte. Weitere Signale des ^{13}C -Spektrum des Edukts und Produkts, sind in Tabelle 9 zugeordnet.

Tabelle 9: Zuordnung der Signale im ^{13}C -Spektrum von Edukt und Produkt der polymeranalogen Umsetzung (Abbildung 80).

Signal [ppm]	Zuordnung in P(DMAA- <i>co</i> -MAC ₂ AE- <i>co</i> -MABP- <i>co</i> -PyMA)	Zuordnung in P(DMAA- <i>co</i> -AEMAC- <i>co</i> -MABP- <i>co</i> -PyMA)
175,9–174,5	Carbonylkohlenstoffe DMAA, MABP C1	Carbonylkohlenstoff DMAA, MABP C1, C9
169,5	–	C7
167,4	–	C6
130,0–128,5	Aromatische C-Atome MABP, PyMA	Aromatische C-Atome MABP, PyMA
53,8	–	C10
37,9–34,3	Methyl- und Methylengruppen Polymerrückgrat, DMAA C2, C3	Methyl- und Methylengruppen Polymerrückgrat, DMAA C2, C3, C4, C5
25,8	C8	–

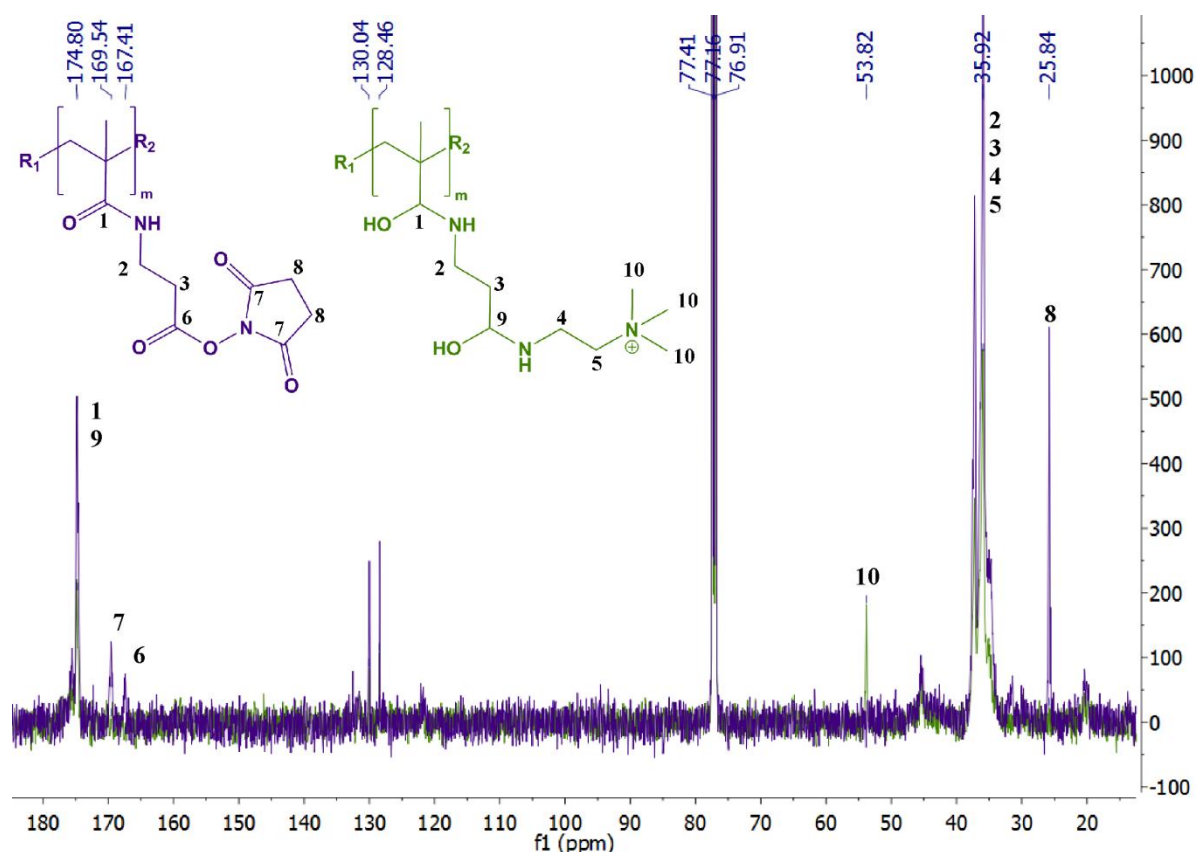


Abbildung 80: ^{13}C -NMR von P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) (in Violett) und P(DMAA-*co*-AEMAC-*co*-MABP-*co*-PyMA) (in Grün) in CDCl_3 bei 500 Hz im Vergleich. Zuordnung der Signale erfolgt in Tabelle 9.^[132]

6.1.2. Polymeranaloge Umsetzung auf Papiersubstraten

Wird P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) zunächst ortsspezifisch an ein gegebenenfalls bereits mikrostrukturiertes Papiersubstrat gebunden und anschließend mit einer leicht basischen, methanolischen Lösung von AEMAC behandelt (Details in Abschnitt 9.7.1), wird erwartet, dass die PU heterogen direkt am papiergebundenen Polymer erfolgt. Ein definitiver Nachweis dieser heterogenen Reaktion war aufgrund der geringen Konzentration modifizierter Gruppen trotz einer Vielzahl von Messmethoden nicht trivial. Dennoch soll in diesem Abschnitt beschrieben werden, wie die heterogene PU anhand von Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR), Ladungstitration, Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) und Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurde und worin die Schwierigkeiten in einem eindeutigen chemischen Nachweis lagen.

FTIR-Spektroskopie

Zunächst wurde versucht, den Erfolg der heterogenen PU mittels FTIR-Spektroskopie nachzuweisen. Ziel war, die Spektren der polymermodifizierten Papiere vor und nach der heterogenen PU in Bezug auf die charakteristischen Banden des *N*-Hydroxy-Succinimids bei 1738 cm^{-1} , 1782 cm^{-1} und 1813 cm^{-1} zu untersuchen. Durch Unterschiede in den Spektren (vgl. Abschnitt 6.1.1) sollte ein Hinweis auf die Umsetzung des NHS-Esters erhalten werden. Die Spektren der polymermodifizierten Proben vor und nach der PU (Abbildung 81) zeigten allerdings keinen signifikanten Unterschied in der Transmission. Dies könnte entweder darauf hinweisen, dass eine heterogene PU nicht stattgefunden hat, oder es wurde an Stellen gemessen, an denen ein eindeutiges Signal für den Aktivester bzw. den umgesetzten Aktivester aufgrund zu geringer

Polymerkonzentration nicht nachweisbar war. Dies wird noch deutlicher im Vergleich der Spektren der Proben mit dem FTIR-Spektrum von unmodifiziertem Eukalyptussulfatpapier (Abbildung 81), denn es fiel auf, dass bereits das aufgebrauchte Polymer nicht sicher nachzuweisen ist. Lediglich eine schwache Änderung der Absorptionen im Wellenlängenbereich von $1600\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$ wies auf eine Polymeranbindung hin. In Anbetracht der Tatsache, dass nur ca. 15 mol-% des schwer zu detektierenden Polymers eine Änderung der Schwingungen nach der PU erwarten lassen, führte zu der Erkenntnis, dass wahrscheinlich die Auflösung der Methode nicht ausreichend für den Nachweis der polymeranalogen Reaktion war. Aus diesem Grund konnte kein Unterschied in den Spektren der Proben vor und nach der heterogenen PU detektiert werden und keine Aussage über den Erfolg oder Misserfolg der PU getroffen werden.

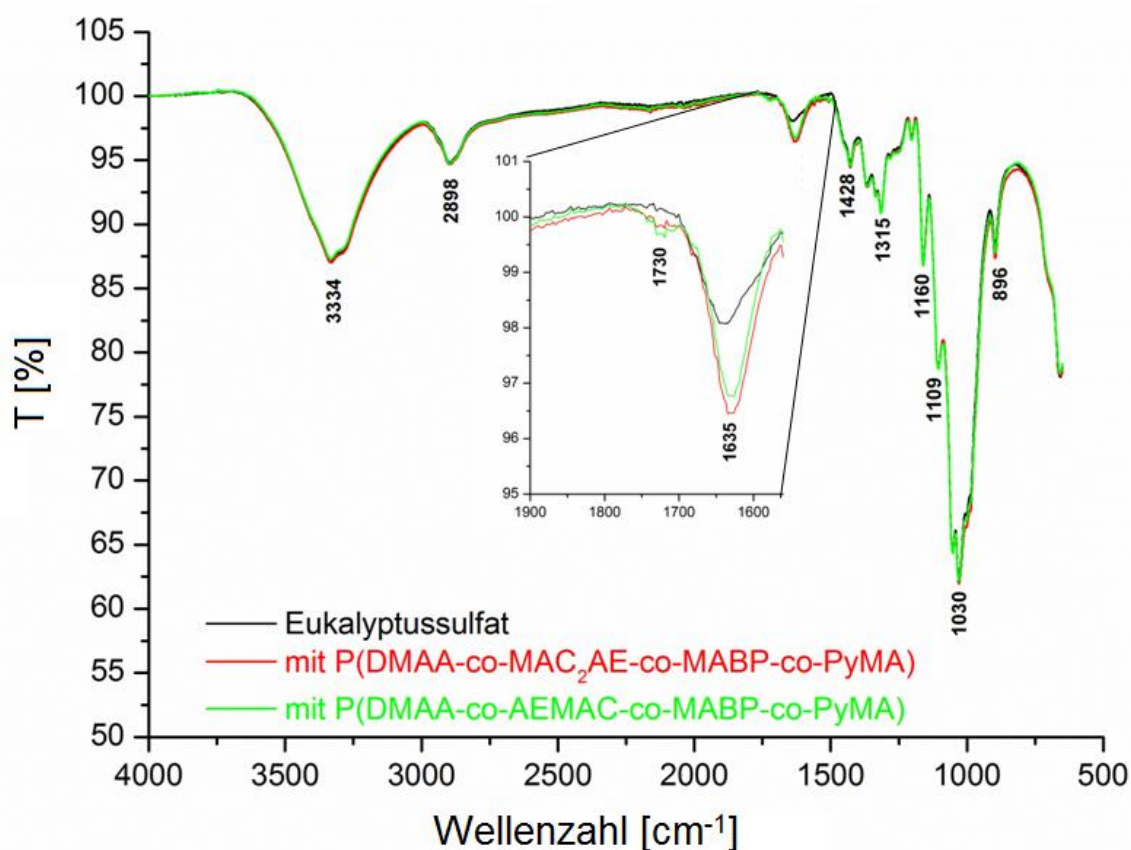


Abbildung 81: FTIR-Spektren des unmodifizierten Eukalyptussulfatpapiers (schwarz), des Papiers modifiziert mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) vor der PU (rot) und nach der PU (grün).

Ladungstitrations

Ein alternativer Ansatz verfolgte das Ziel, die in der heterogenen PU eingebrachten Ladungen zu detektieren und so den Nachweis einer erfolgreichen Reaktion zu erbringen. Für die Untersuchung der Ladung von Faserstoff stehen generell zwei Methoden zur Verfügung: Zetapotentialmessung oder polyelektrolytasierte Ladungstitrations. Da für Zetapotentialmessungen eine zu große Menge modifizierten Materials benötigt würde, wurde ein Ladungsnachweis mittels Ladungstitrations angestrebt.

Zur Ladungstitrations einer Zellstoffprobe muss eine Rücktitration durchgeführt werden. Dabei wird die Zellstoffprobe in der Polyelektrolytlösung des gegensätzlich geladenen Polymers inkubiert. Anschließend wird der Zellstoff abfiltriert und das Filtrat zurücktitriert, um die Menge an nicht verbrauchtem Polymer zu bestimmen. Die Ladungsmenge am Äquivalenzpunkt berechnet sich nach

Gleichung 20. Als Volumen des verbrauchten Titriermittels V wird das Differenzvolumen ΔV (Gleichung 21) eingesetzt. Es ergibt sich als Differenz aus dem in einem Referenzexperiment verbrauchten Volumen an Polyelektrolytlösung V_2 und des in der Rücktitration zu dosierten Volumens an Polyelektrolytlösung V_1 (Gleichung 21).^[156]

$$q \left[\frac{\mu eq}{g} \right] = \frac{V [mL] \cdot c \left[\frac{eq}{L} \right] \cdot 1000}{w [g]} \quad (20)$$

q : Ladungsmenge der Probe

V : Volumen des verbrauchten Titriermittels

c : Molarität des verbrauchten Titrationsmittels

w : Feststoffgehalt der eingesetzten Probe

$$\Delta V = (V_2 - V_1) \quad (21)$$

In Erwartung einer positiven Ladung wurden die mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-beschichteten und heterogen mit AEMAC modifizierten Papierproben zunächst in einer Polyethylensulfonat (PES)-Lösung inkubiert. Als Referenz dienten P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-beschichtete aber nicht mit AEMAC behandelte Papiere. Nach der Inkubation wurden Zellstoffreste abgetrennt und 10 mL der beiden Lösungen mit einer Poly-diallyl-dimethylammoniumchlorid (PDADMAC)-Lösung rücktitriert (V_1 in Gleichung 21). Zusätzlich wurden 10 mL reine PES-Lösung als Vergleichswert (V_2 in Gleichung 21) titriert (Abbildung 82). In Tabelle 10 sind die bis zum Ladungsnullpunkt zutitrierter Volumina sowie die daraus anhand von Gleichung 20 berechneten Ladungsmengen aufgeführt.

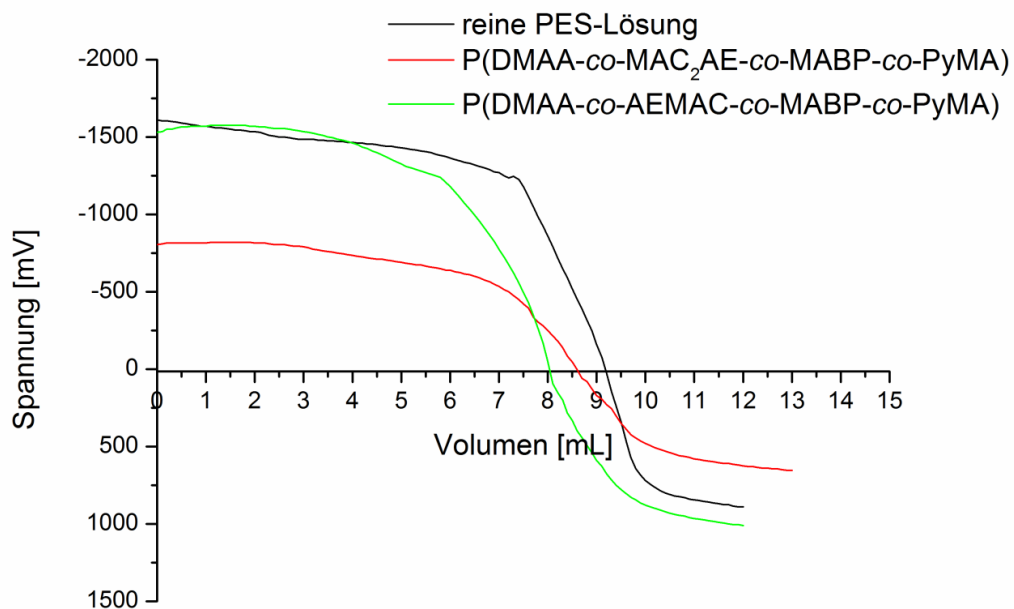


Abbildung 82: Titrationskurven der reinen PES-Lösung als Vergleichswert sowie der mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-beschichteten aber nicht mit AEMAC behandelten Papiere als Referenz. Darstellung erfolgt im Vergleich zu mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-beschichteten und heterogen polymeranalog modifizierten Papieren als Probe.

Tabelle 10: Ergebnisübersicht der Messungen der polyelektrolytisierten Ladungstiteration zur Bestimmung der Oberflächenladung heterogen modifizierter und unmodifizierter Fasern von Eukalyptussulfat im Vergleich.

Probe	Äquivalenzpunkt [mL]	Differenzvolumen (15 mL Probe) [mL]	Einwaage [mg]	Ladungsmenge [$\mu\text{eq g}_{\text{Faser}}^{-1}$]
Referenz PES	8,77			
P(DMAA- <i>co</i> - MAC ₂ AE- <i>co</i> - MABP- <i>co</i> -PyMA)	8,40	0,55	99,9	+5,5
P(DMAA- <i>co</i> - AEMAC- <i>co</i> - MABP- <i>co</i> -PyMA)	7,70	1,61	100,0	+16,0

Durch die heterogene Modifikation der Papierproben sollen positive Ladungen in das Fasernetzwerk eingebracht werden. Folglich wurde erwartet, dass in der mit AEMAC behandelten Probe eine positive Gesamtladung detektiert werden kann. Als Referenz diente eine nicht mit AEMAC behandelte Papierprobe, in der die inhärente negative Ladung der Cellulosefasern ausschlaggebend sein sollte. Anhand der beschriebenen Methodik der Rücktitration kann allerdings nur eine positive Ladung detektiert werden, sodass für die Referenz keine Ladung detektiert werden sollte. Den Erwartungen entsprechend konnte für die heterogen modifizierten Papierproben eine positive Ladung von $+16,0 \mu\text{eq g}_{\text{Faser}}^{-1}$ detektiert werden. Allerdings wurde für die Referenzen entgegen den Erwartungen ebenfalls eine positive Ladung, wenn auch eine geringere als für die Probe, detektiert. Einige Erklärungsansätze für diese Beobachtung wie eine zu geringe Sensitivität der Methode der Rücktitration oder eine unspezifische Wechselwirkungen der Cellulosefasern oder des angebundenen Polymeres mit den Polyelektrolytmolekülen sind möglich, wurden aber nicht eingehend untersucht.

Nach Literatur^[156] ist eine quantitative Auswertung der Ladungsmenge durch Strömungspotentialmessungen aufgrund der Vielzahl von Einflussparametern (wie Leitfähigkeit, Viskosität, Molekulargewicht oder Temperatur der Probe) kritisch zu sehen. Daher musste anhand dieser Daten davon ausgegangen werden, dass die Methode der Ladungstiteration anhand von Rücktitration zur Erörterung der Frage nach einer erfolgreichen heterogenen PU zur gezielten Einbringung positiver Ladungen wenn überhaupt nur qualitative Aussagen treffen kann.

XPS-Spektroskopie

Schließlich wurde der Ansatz verfolgt, die heterogene PU mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) nachzuweisen. Ansatzpunkt war die Tatsache, dass mithilfe der Photoemission meist die verschiedenen Valenzzustände eines Elements voneinander unterschieden werden können.^[157] Konkret ist nach Yang *et al.*^[154] dem Stickstoffatom des tertiären Amids des DMAAs im Polymer ein Signal bei 400,2 eV zuzuordnen, während ein quartäres Amin nach Artyushkova *et al.*^[158] ein Signal bei 402 eV hervorruft. Auch die *N*-Hydroxysuccinimid-Funktion wird bei 402,3 eV^[159] detektiert. Allerdings konnte angenommen werden, dass ein NHS-Ester unter basischen Bedingungen zumindest zum Teil hydrolysiert wird. Daher könnte bei Vorhandensein eines Signal bei 402 eV nach basischer Behandlung mit AEMAC-Lösung davon ausgegangen werden, dass dieses hauptsächlich auf das mittels AEMAC eingeführte quartäre Amin zurückzuführen ist.

Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurde ein XPS-Spektrum von mit P(DMAA-co-MABP)-beschichtetem Papier mit einem XPS-Spektrum von polymeranalog heterogen umgesetzttem P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-beschichtetem Papier verglichen (Details siehe Abschnitt 9.7.1). Die Spektren der beiden Proben für den Bindungsenergiebereich des N1s-Peaks sind vergleichend in Abbildung 83 dargestellt. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proben auszumachen. Dies erlaubte zwei verschiedene Schlussfolgerungen: Einerseits könnte vermutet werden, dass eine Hydrolyse des NHS-Esters stattgefunden hat, also die PU nicht erfolgreich war. In diesem Fall wären alle nach der Umsetzung im Polymer enthaltenen Stickstoffatome in Form von Amidfunktionen enthalten und bei einer Bindungsenergie von ca. 400 eV^[154] angesiedelt, sodass keine Peakaufspaltung des N1s-Peaks für Probe und Referenz zu erwarten wäre. Alternativ könnte der Anteil an eingebautem quartären, geladenen Aminen nicht ausreichend groß für eine Detektion sein, denn nur ca. 15 mol-% Monomer des spärlich in einem Cellulosefasernetzwerk gebundenen Polymers enthalten die relevante Funktion. Ob die Nachweisgrenze der XPS von 0,1 at.-%–2 at.-%^[160] unterschritten wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden. Letztlich war anhand der Daten nicht eindeutig zu entscheiden, welcher der beiden Gründe dafür verantwortlich sein könnte, dass keine Aufspaltung des N1s-Peaks zu beobachten war. Daher konnte eine erfolgreiche heterogene PU weder bejaht noch ausgeschlossen werden.

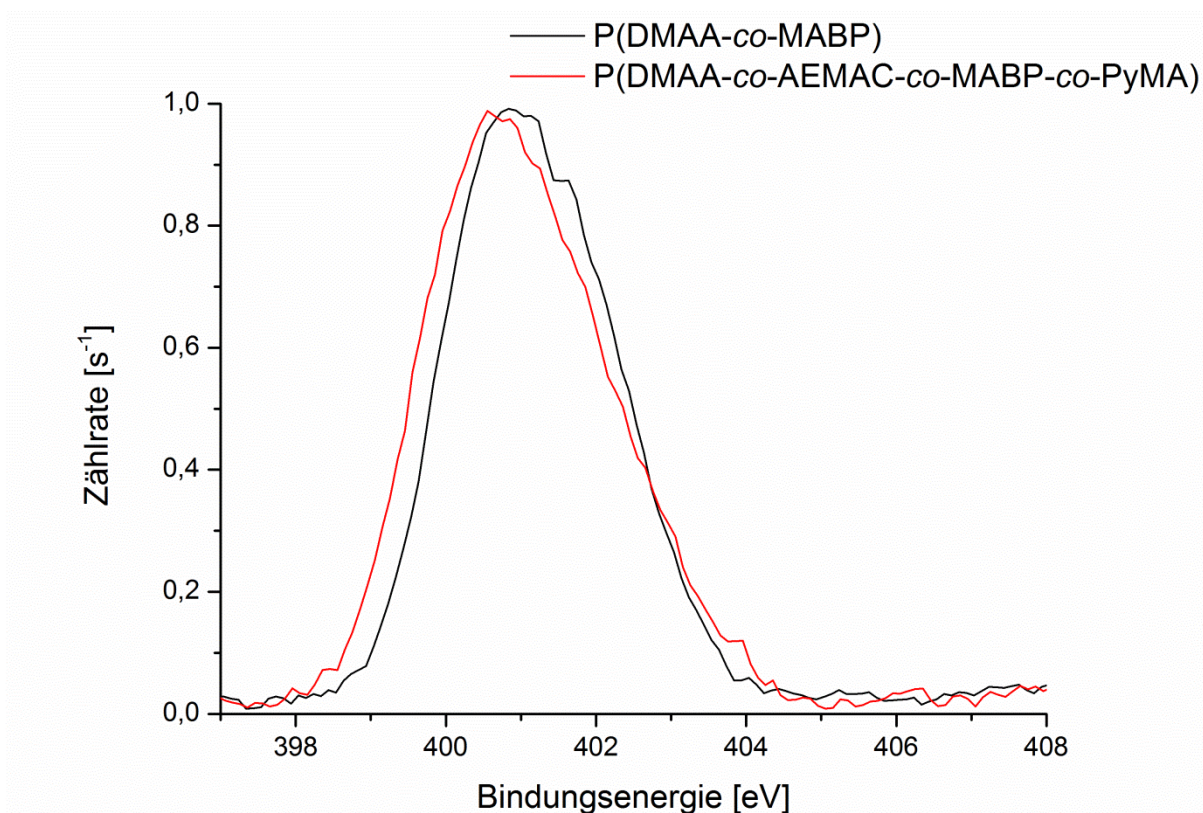


Abbildung 83: Überlagerung der XPS-Spektren (N1s) von mit P(DMAA-co-MABP) beschichtetem Papier (schwarz) und mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) beschichtetem Papier heterogen polymeranalog umgesetzt zu P(DMAA-co-AEMAC-co-MABP-co-PyMA) (rot).

Fluoreszenzmikroskopie

Da die Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie, Ladungstiteration und XPS-Spektroskopie eine Anbindung von AEMAC in einer heterogenen polymeranalogen Umsetzung weder eindeutig belegen noch widerlegen konnten, wurde ein alternativer Ansatz zum Nachweis verfolgt. Anstelle von AEMAC sollte ein Fluoreszenzfarbstoff mit primärer Amingruppe spezifisch an die *N*-Hydroxy-Succinimidfunktion des Polymers binden. Die selektive Bindung sollte anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden, um allgemein nachzuweisen, dass die beschriebene PU auch heterogen stattfindet. Als Fluoreszenzfarbstoff wurden Fluoresceinamin und Aminoethylrhodamin B^[24, 161] (Abbildung 84) verwendet.

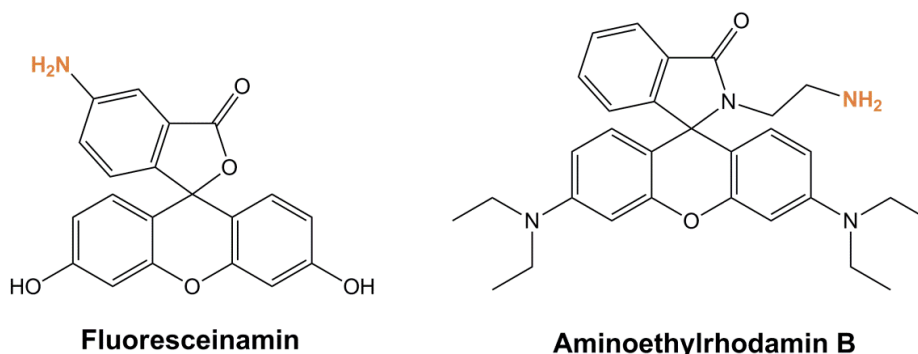


Abbildung 84: Chemische Struktur der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Die primäre Amingruppe zur Anbindung an die *N*-Hydroxy-Succinimidfunktion in P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP) ist farbig markiert.

Zunächst sollte die Eignung der Farbstoffe für einen Nachweis der selektiven Anbindung mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. In einem Vorexperiment wurde der Einfluss des verwendeten Polymers P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP) auf die Absorption des Farbstoffs untersucht. Dazu wurde die Farbstoffabsorption der reinen Farbstofflösung mit der Absorption einer Lösung, die die gleiche Menge Farbstoff und zusätzlich gelöstes Polymer enthalten, verglichen. Die Farbstoffe sind geeignet für einen Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie, wenn die Farbstoffadsorption in der reinen Farbstofflösung und der Lösung mit Polymer einander entsprechen.

Für Fluoresceinamin wurde dabei bereits mit bloßem Auge festgestellt, dass das verwendete Polymer die Fluoreszenz von Fluoresceinamin auslöscht. Die Lösung der Mischung von Polymer und Farbstoff war deutlich farbloser, als die Referenzlösung des Farbstoffs. Der Mechanismus wurde nicht weiter untersucht, da Fluoresceinamin für den Nachweis der Anbindung so ausschied.

Die Farbstoffabsorption von Aminoethylrhodamin B wurde mittels UV-VIS-Spektroskopie überprüft (Abbildung 85). Eine sehr ähnliche Absorption der Farbstoffreferenzlösung und der gemischten Probelösung verdeutlichte, dass das Polymer die Absorption von Aminoethylrhodamin B nicht beeinflusst und daher generell geeignet für einen Nachweis der ortsspezifischen Anbindung eines primären Amins an die *N*-Hydroxy-Succinimidfunktion des Polymers ist.

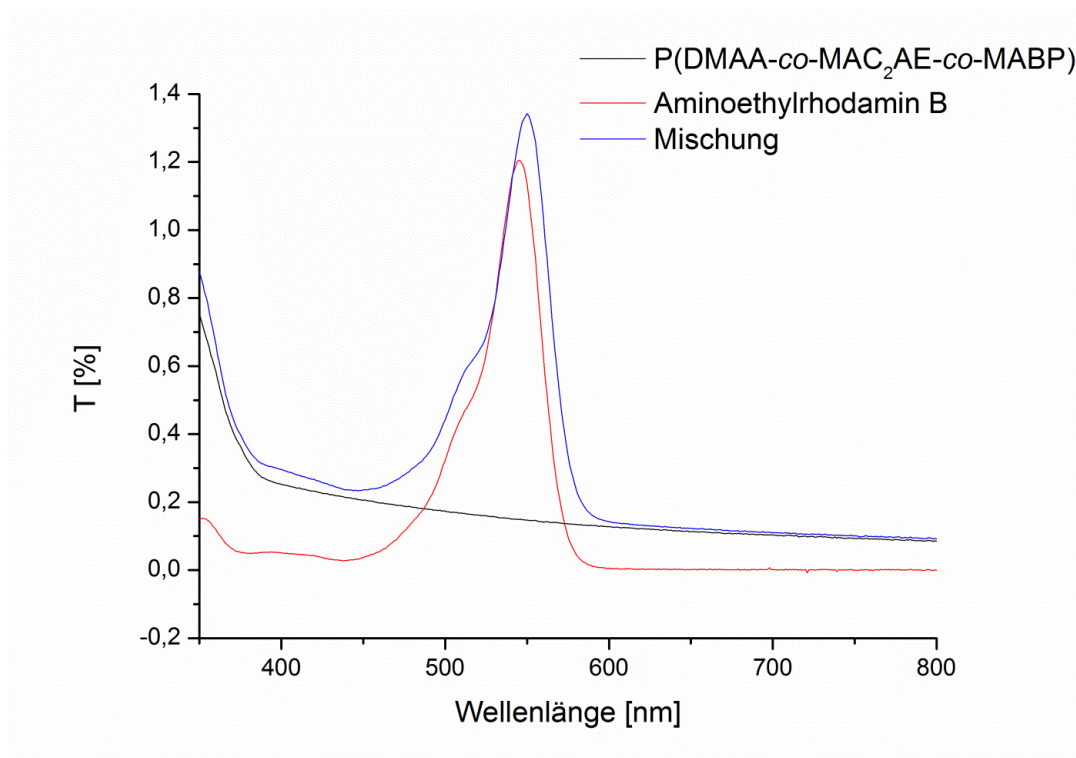
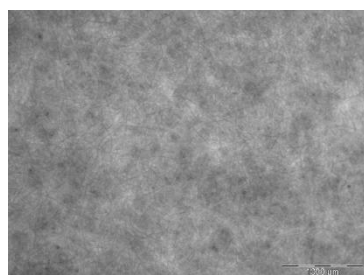


Abbildung 85: Überlagerung der UV-VIS-Spektren der Referenzlösungen von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP) (schwarz) und Aminoethylrhodamin B (rot) sowie der gemischten Probelösung (blau).

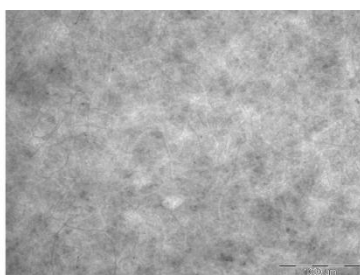
Daraufhin wurden als Referenzproben unmodifiziertes Eukalyptussulfatpapier und mit P(DMAA-co-MABP)-modifiziertes Papier sowie als Probe ein mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP)-modifiziertes Papier vorbereitet. Alle drei Papiere wurden mit Aminoethylrhodamin B behandelt und extrahiert (Details der Durchführung in Abschnitt 9.7.1). Anschließend wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht, ob die Probe im Gegensatz zu den Referenzen durch die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs fluoresziert.

Dabei war ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenz der Proben zu beobachten (Abbildung 86). Unmodifiziertes Eukalyptussulfatpapier fluoreszierte aufgrund des Restligninanteils schwach. Die Referenzprobe modifiziert mit P(DMAA-co-MABP) fluoreszierte aufgrund des gebundenen Polymers oder sehr geringer Mengen unspezifisch gebundenen Aminoethylrhodamin B etwas stärker. Die Probe modifiziert mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP) wies hingegen nahezu keine Fluoreszenz auf. Dieser deutliche Unterschied in der Fluoreszenz kann als indirekter Beweis dafür gewertet werden, dass eine Reaktion stattgefunden hat.

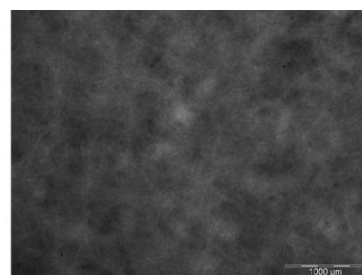
Unerwartet war allerdings die Tatsache, dass die Fluoreszenz der Probe am geringsten ist. Erwartet wurde eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz der Probe im Gegensatz zu den Referenzen aufgrund der Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs. Möglicherweise kann Aminoethylrhodamin B nach einer kovalenten Anbindung an den NHS-Ester in P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP) nicht mehr durch Anregung bei 366 nm in seine fluoreszente Form (vgl. Schäfer *et al.* ^[161]) überführt werden. Dies würde erklären, warum keine deutlich erhöhte Fluoreszenz der Probe beobachtet werden konnte, obwohl eine kovalente Anbindung stattgefunden hat.



Referenz unmodifiziertes Papier
Grauwert: 145 ± 13



Referenz P(DMAA-co-MABP)
Grauwert: 177 ± 15



Probe P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP)
Grauwert: 71 ± 11

Abbildung 86: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Aminoethylrhodamin B behandelten Papiere im Vergleich. Links: unmodifiziertes Eukalyptussulfatpapier. Mitte: P(DMAA-co-MABP) beschichtetes Eukalyptussulfatpapier. Rechts: P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP) beschichtetes Papier.

6.2. *Proof-of-Concept*-Experiment für die gezielte, ortsspezifische Retention von Tartrazin in Papier

Eine homogene PU von AEMAC mit den in P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) enthaltenen NHS-Estern war nachweislich erfolgreich (Abschnitt 6.1.1). Für eine erfolgreiche heterogene PU gab es deutliche Hinweise (Abschnitt 6.1.2). Daher wurde versucht, anhand dieser Methode dem Ziel einer Erhöhung der Sensitivität von μ PADs (Kapitel 2) näher zu kommen. Dazu sollte in einem Modellexperiment die Retention des negativ geladenen Modellfarbstoffs Tartrazin durch ortsspezifisches Einbringen positiver Ladungen in mikrostrukturierte Papiersubstrate erhöht werden, um den Farbstoff besser detektieren zu können.

Basierend auf den bisher beschriebenen Untersuchungen waren zwei Möglichkeiten zur ortsspezifischen Einbringung positiver Ladungen in ein mikrostrukturiertes Papiersubstrat vorstellbar: Einerseits könnte das bereits in Lösung polymeranalog umgesetzte Polymer photolithographisch angebunden werden. Andererseits könnte die Einbringung der Ladung durch eine heterogene PU erfolgen.

An dieser Stelle sollten nun die beiden beschriebenen Möglichkeiten zum Einbringen einer positiven Ladung in einen mikrostrukturierten Kanal untersucht und verglichen werden. Zur eindeutigen Unterscheidung der Proben wurden im Folgenden Proben, die mit in Lösung polymeranalog umgesetztem Polymer mikrostrukturiert wurden als "in Lösung umgesetzt" bezeichnet. Proben, deren Polymerpatch heterogen polymeranalog umgesetzt wurde, wurden im Folgenden als "heterogen umgesetzt" bezeichnet. Als Referenzproben wurden darüber hinaus Proben mit "nicht umgesetzten", also ungeladenen, P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patches und eine Kanalstruktur ohne jeglichen Polymerpatch ("kein Polymer") vorbereitet. Diese vier Proben wurden vergleichend auf die Retention von negativ geladenem Modellfarbstoff Tartrazin untersucht.

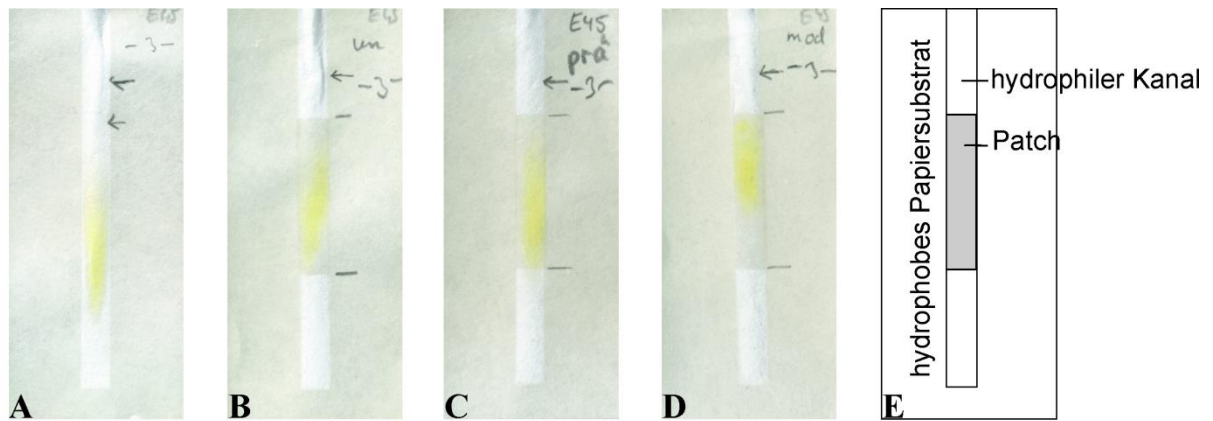


Abbildung 87: Fotografien mikrostrukturierter Kanäle nach einem Retentionsexperiment (Tartrazinlösung: 4 mmol, pH 7, 25 mS cm⁻¹; Fluidreservoir: pH 7, 25 mS cm⁻¹). (A) zeigt eine Kanalstruktur "ohne Polymer"-Patch, (B) eine Struktur mit "nicht umgesetztem" Polymerpatch, (C) eine Struktur mit "in Lösung umgesetztem" Polymer-Patch, (D) eine Struktur mit "heterogen umgesetztem" Polymerpatch und (E) eine schematische Darstellung der in den Fotografien dargestellten Proben.^[132]

Zur Quantifizierung der Retention in mikrostrukturierten Systemen mit Patches wurde eine neue Größe eingeführt, der auf die Patchlänge normierte Retentionsfaktor R_f (Patch). Er ist definiert als der Quotient der Strecke, die der Farbstoff ausgehend vom Patchanfang zurücklegt d (Farbstoff), durch die Gesamtlänge des Patches d (Patchlänge) (Gleichung 22). Nach dieser Definition entspricht ein kleinerer Wert einer stärkeren Retention. Werte >1 werden erreicht, wenn die Farbstoffmoleküle auch über die Grenzen des Patches hinaus transportiert werden. Diese Größe ermöglicht es, die Erhöhung der Retention negativer Farbstoffmoleküle durch die eingebrachte positive Ladung im Patch im Vergleich zu ungeladenen Strukturen anschaulich darzustellen.

$$R_f (\text{Patch}) = \frac{d (\text{Farbstoff})}{d (\text{Patchlänge})} \quad (22)$$

Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 88 dargestellt.

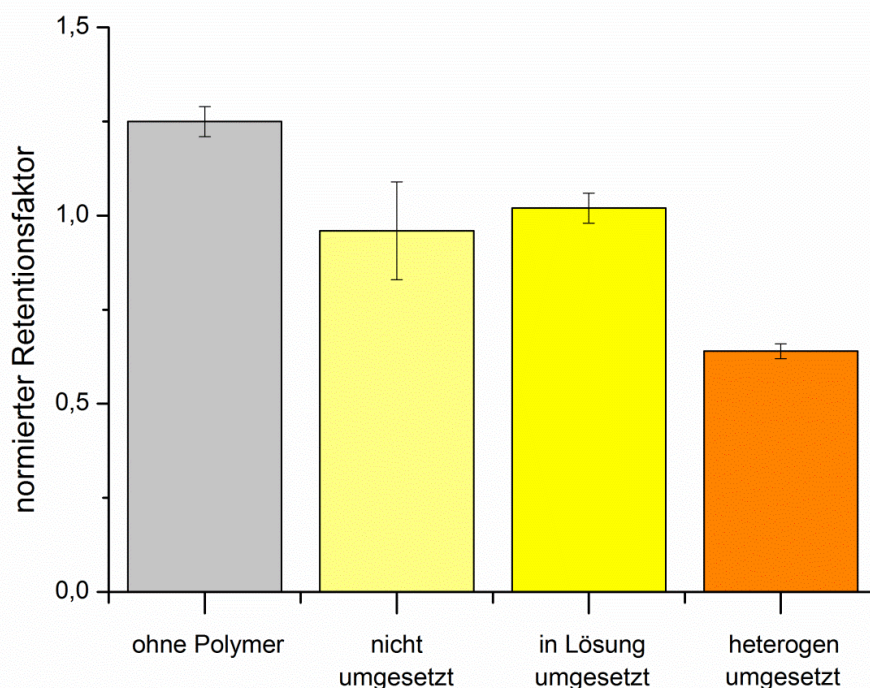


Abbildung 88: R_f (Patch) für einen $0,5 \mu\text{L}$ Spot einer Tartrazinslösung (4 mmol , $\text{pH } 7$, 25 mS cm^{-1}) in mikrostrukturierten Kanälen ohne Patch, mit Patch aus "nicht umgesetzten" Polymer, mit Patch aus "in Lösung umgesetzten" Polymer und "heterogen umgesetzten" Polymer.^[132]

Ergebnisse des heterogen umgesetzten Polymer-Patches

Die Retention des negativ geladenen Farbstoffs wurde durch die Einbringung der positiven Ladung im heterogen umgesetzten Patch signifikant erhöht, was ein im Vergleich zu den beiden Referenzproben geringerer R_f (Patch) verdeutlichte. Der negativ geladene Farbstoff wurde ortsspezifisch am Beginn der positiv geladenen Patchstruktur deutlich stärker reterniert als in der Referenzprobe mit ungeladenem Polymerpatch ("nicht umgesetzt"). Eine verstärkte Retention durch unspezifische Wechselwirkungen mit den nicht ladungsbasierten Polymerelementen des Patches konnte ausgeschlossen werden. Der Ansatz einer ladungsbasierten Erhöhung der Retention (Abschnitt 6.1) war somit erfolgreich und konnte für einen Versuch der gezielten Erhöhung der Sensitivität eines μPADs genutzt werden (Abschnitt 6.3).

Darüber hinaus konnte dieses Ergebnis als funktionaler Nachweis der heterogenen PU betrachtet werden. Eine erhöhte Retention des negativen Farbstoffes spricht eindeutig für eine Einbringung positiver Ladungen in die Patchregion. Unter der Voraussetzung, dass im Vorhinein belegt werden konnte, dass AEMAC nicht unspezifisch an unbeschichtetes oder mit polymerbeschichtetes Papier bindet (aus Gründen der Stringenz in Abschnitt 9.7.2), konnte die kovalente Anbindung des AEMAC an den NHS-Ester durch diese Ergebnisse somit indirekt belegt werden.

Vergleich mit in Lösung umgesetztem Polymer-Patch

Interessant war, dass für die Proben mit in Lösung umgesetztem Polymer keine erhöhte Retention im Vergleich zu den ungeladenen Referenzproben zu beobachten war. In Lösung umgesetzte Proben zeigten einen ähnlichen R_f (Patch), wie die nicht umgesetzte Vergleichsprobe. Dies ließ darauf schließen, dass die nachweislich vorhandenen positiven Ladungen (Abschnitt 6.1.1) bei der

Retention der negativ geladenen Modellfarbstoffe nicht involviert waren. Folglich ist diese Form der PU für eine Anwendung zur Erhöhung der Sensitivität in μ PADs nicht geeignet.

Als qualitative Erklärung für diese Beobachtung wurde die in Abbildung 89 graphisch verdeutlichte Hypothese ausgearbeitet. Wird das in Lösung umgesetzte und daher bereits bei Anbindung positiv geladene Polymer auf die negativ geladene Papieroberfläche aufgebracht, richten sich die positiv geladenen Gruppen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen bevorzugt in Richtung der negativ geladenen Papieroberfläche aus. Durch die anschließende kovalente Anbindung und Vernetzung wurde das Polymer in dieser Ausrichtung fixiert (Abbildung 89, links). Das bei der photolithographischen Fixierung noch ungeladene P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) wies hingegen keinerlei Ausrichtung auf. Die in einem zweiten Schritt heterogen eingebrachten Ladungen wurden folglich statistisch im Polymernetzwerk verteilt. Die Wahrscheinlichkeit, dass positive Gruppen direkt benachbart zur negativ geladenen Faseroberfläche liegen, war genauso groß wie deren Ausrichtung ins Poreninnere. (Abbildung 89, rechts). Eine nachträgliche Ausrichtung positiver Gruppen im Polymernetzwerk in Richtung negativ geladener Faser wurde als unwahrscheinlich angesehen, denn dazu müsste das gesamte, gequollene Polymernetzwerk "kollabieren", was thermodynamisch ungünstig wäre.

Wird eine Lösung des negativ geladenen Tartrazinfarbstoffs durch die Patches geleitet, können die Tartrazinmoleküle ausschließlich mit den positiven Ladungen, die ins Poreninnere gerichtet sind, elektrostatisch wechselwirken. Da solche Gruppen in den Polymerpatches der in Lösung umgesetzten Proben kaum vorliegen, war die beobachtete Retention äquivalent der einer ungeladenen Referenzprobe. In den heterogen umgesetzten Proben waren positive Ladungen für die negativen Tartrazinmoleküle zugänglich, was eine erhöhte, elektrostatisch basierte Retention hervorrief.

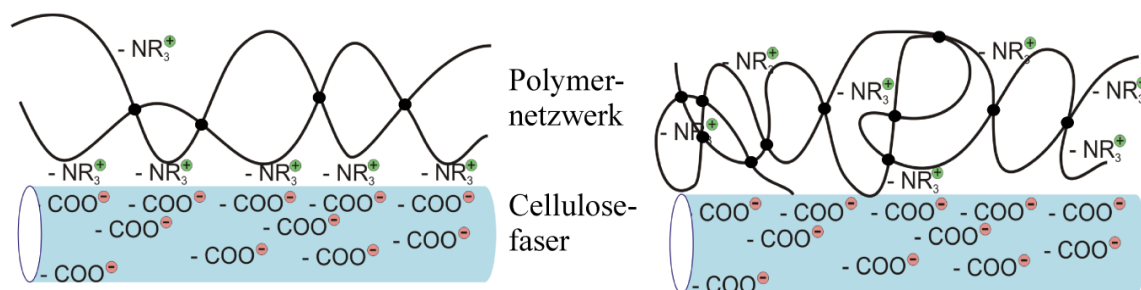


Abbildung 89: Qualitative schematische Darstellung der Polymerorientierung an Cellulosefasern für "in Lösung umgesetzte" Polymere (links) und "heterogen umgesetzte" Polymere (rechts). Schwarze Punkte beschreiben kovalente Verknüpfungen der Polymerketten untereinander nach einer Bestrahlung mit UV-Licht.^[132]

6.3. Aufkonzentration von Tartrazin in μ PADs

Da die ortsspezifische Erhöhung der Retention negativ geladener Farbstoffmoleküle in heterogen umgesetzten Polymerpatches in einem *Proof-of-Concept*-Experiment (Abschnitt 6.2) erfolgreich belegt werden konnte, sollte eine solche Struktur nun genutzt werden, um gezielt die Sensitivität eines μ PADs unter Modellbedingungen zu steigern. Es wurde erwartet, dass die negativ geladenen Farbstoffmoleküle einer hoch verdünnten Tartrazinlösung ortsspezifisch im vorderen Bereich der positiv geladenen Patchstruktur reterniert und so konzentriert werden. Dies würde eine kolorimetrische Detektion des Farbstoffs erleichtern und so dessen Nachweisgrenze erhöhen. Anschaulich dargestellt: Eine Probe, die so stark verdünnt ist, dass der Farbstoff in der

Kanalstruktur kaum wahrzunehmen ist und bei einer Detektion im Hintergrundrauschen verschwindet, sollte durch die Aufkonzentration im Patchbereich sicht- und detektierbar werden. Dieser Ansatz wurde anhand des folgenden Experiments untersucht. Drei hochverdünnte Tartrazinlösungen ($0,3$; $0,15$ und $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$) wurden durch mikrostrukturierte Kanäle mit heterogen umgesetzten Polymerpatches geleitet. Als Referenz wurden diese Lösungen darüber hinaus durch Kanalstrukturen mit nicht umgesetzten Polymerpatches sowie ohne Polymerpatch geleitet. Bereits mit bloßem Auge wurde deutlich, dass in den Referenzproben nur schwer zu erkennender Farbstoff durch Aufkonzentration im vorderen Bereich des heterogen umgesetzten Polymerpatches akkumuliert und so deutlich erkennbar wurde (Abbildung 90).

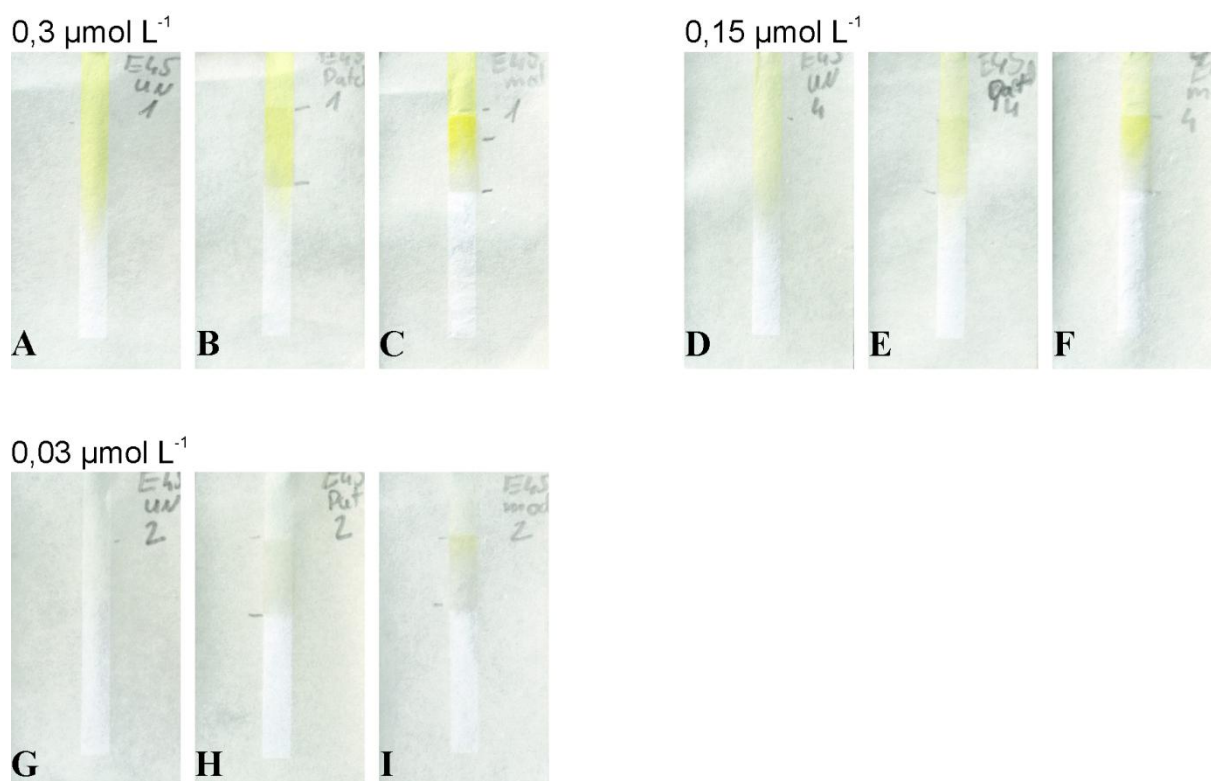


Abbildung 90: Exemplarische Scans der Retentionsexperimente zur Aufkonzentration von Tartrazin in μPADs . (A–C) Retentionsexperimente mit einer Tartrazinlösung der Konzentration $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$; (D–F) Retentionsexperimente mit einer Tartrazinlösung der Konzentration $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$; (G–I) Retentionsexperimente mit einer Tartrazinlösung der Konzentration $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$. Jeweils von links nach rechts die Scans der Experiment ohne Polymer, mit nicht umgesetztem Polymerpatch und heterogen umgesetztem Polymerpatch.

Zur quantitativen Auswertung wurde der mittlere Grauwert (MGV) des ersten Millimeters des Patches bzw. in der Kanalstruktur ohne Polymerpatch des entsprechenden Bereichs ermittelt (Details in Abschnitt 9.7.4). Der maximale MGV für Weiß liegt bei 250. Ein tiefschwarzer Bereich hat einen MGV von 0. Das bedeutet, eine lokal erhöhte Tartrazinkonzentration ruft einen dunkleren Grauton hervor, der einen geringeren MGV zur Folge hat. Der bereits qualitativ erlangte Eindruck ließ sich quantitativ bestätigen (Abbildung 91). Der MGV des Patches aus heterogen umgesetztem Polymer wies über alle Konzentrationen einen signifikant geringeren Wert als die Referenzproben auf. Eine auf elektrostatischer Wechselwirkung beruhende Aufkonzentration war erfolgreich. Weiterhin war zu bemerken, dass der MGV der Probe mit nicht umgesetztem Polymer gegenüber den Proben ohne Polymer bei allen Konzentrationen etwas geringer ausfiel. Dies ließ schwache unspezifische Wechselwirkungen des Farbstoffes mit dem Polymer vermuten. Dennoch war die

Abnahme des MGVs in Proben mit heterogen umgesetzten Polymerpatches signifikant. Konkret konnte festgestellt werden, dass der MGW bei einer Konzentration der Tartrazinlösung von $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ in der Probe mit Patch aus heterogen umgesetzten Polymer genauso hoch ist, wie bei der nächst höheren Konzentration der Tartrazinlösung von $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ in der Referenzprobe ohne Patch. Das bedeutet, dass eine fünfmal niedrigere Konzentration an Analyt durch die auf elektrostatischer Wechselwirkung beruhende Aufkonzentration messbar wird.

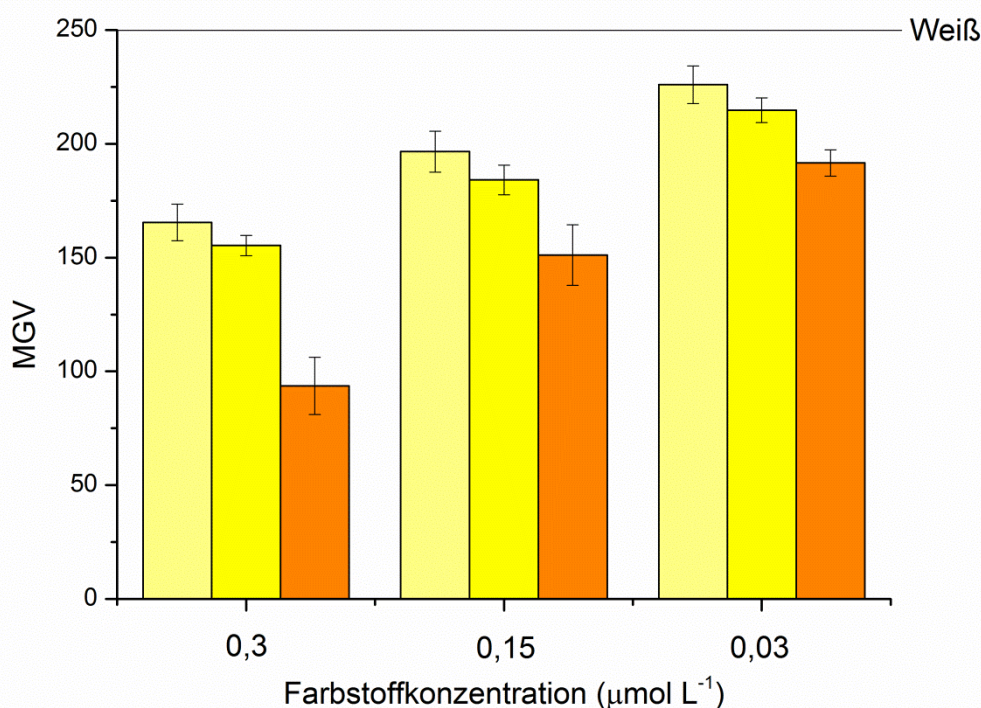


Abbildung 91: Mittlerer Grauwert (MGV) der Referenzproben ohne Patch in Hellgelb, mit Patch aus "nicht umgesetzten" Polymer in Gelb und der Proben mit Patch aus "heterogen umgesetzten" Polymer in Orange jeweils bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen (0,3; 0,15 und $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$).^[132]

6.4. Fazit

Die WHO definierte unter dem Akronym "ASSURED" sieben Voraussetzungen, die Analysesysteme für eine Anwendung in Entwicklungsländern erfüllen sollten (Abschnitt 1.4). μPADs erfüllen bereits intrinsisch einige dieser Aspekte. Problematisch war bisher allerdings unter anderem ihre Sensitivität. Daher wurde eine Steuerung der Retention von Modellanalyten zur **Optimierung der Sensitivität von μPADs** als dritte Stufe in dieser Arbeit angestrebt (Kapitel 2). Basierend auf den Erkenntnissen zur Retention von Farbstoffen als Modellanalyte in Papier (Kapitel 5), wurde ein Konzept zur Absenkung ihrer Detektionsgrenze entwickelt. Durch elektrostatische Wechselwirkungen mit lokal eingebrachten positiven Ladungen sollten negativ geladene Farbstoffmoleküle **ortsspezifisch konzentriert** und so besser detektiert werden.

Das Konzept konnte erfolgreich realisiert werden. Es gelang, positive Ladungen ortsspezifisch in μPADs einzubringen, indem zunächst das photoreaktive Polymer P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) photolithographisch an das Substrat gebunden wurde. Anschließend wurde das eingebrachte Polymer durch eine **heterogene polymeranaloge Umsetzung** des NHS-Esters in der MAC₂AE-Monomereinheit mit einem permanent positiv geladenen primären Amin geladen. Ein

erfolgreiches *Proof-of-Concept*-Experiment (Abschnitt 6.2) bot die Grundlage für ein anwendungsbezogenes Experiment zur Aufkonzentration einer stark verdünnten Tartrazinlösung (Abschnitt 6.3). Die aufgrund der starken Verdünnung quantitativ nicht detektierbare Tartrazinlösung konnte in positiv geladenen Polymerpatches so stark konzentriert werden, dass sie über das Hintergrundrauschen hinweg detektiert werden konnte. Konkret konnte so noch eine Tartrazinlösung mit einer fünffach niedrigeren Konzentration im Vergleich zu einer Probe ohne Aufkonzentration detektiert werden.

Offenes Forschungspotential verdeutlicht dieses Kapitel vor allem in Bezug auf **Nachweismöglichkeiten von Reaktionen in Papier**. Die Methoden zur Analyse von Reaktionen in Papierproben, in diesem Fall die heterogene polymeranaloge Umsetzung von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) mit AEMAC, sind noch begrenzt. Abschnitt 6.1.2 zeigte, dass klassische Methoden wie FTIR-Spektroskopie, Ladungstitration oder XPS-Spektroskopie in Papierproben schnell ihre Detektionsgrenzen unterschreiten. In Zukunft sollte vermehrt Forschung betrieben werden, um klassische analytische Methoden (z.B. auch Festkörper-NMR) für Papier zu optimieren bzw. generell nutzbar zu machen. Dies scheitert bis heute meist an ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnissen.

Abschließend soll festgehalten werden, dass eine **weitere Senkung der Detektionsgrenze** von (Modell-) Analyten erstrebenswert ist. Dazu könnte basierend auf dem bereits realisierten Konzept das Ziel einer höheren Ladungsdichte verfolgt werden. Ein guter Ausgangspunkt hierfür wäre es Polymere mit erhöhtem NHS-Anteil zu synthetisieren, in die im Anschluss durch die heterogene PU mehr Ladungen pro Volumen eingebracht werden könnten. Durch das Konzept der Anbindung positiver Ladungen mittels einer PU eines NHS-Esters ist der Grundstein für den Übertrag von Modell- auf Realsysteme gelegt worden, denn an NHS-Ester kann flexibel jede Funktionalität angebunden werden, die mit einer primären Aminfunktion kombiniert werden kann. So bietet dieses Konzept die Grundlage für den **ortsspezifischen Einbau beliebiger Funktionen** in Papier zur gezielten Retention verschiedener Analyten z.B. auch spezieller Antigene durch die Fixierung zugehöriger Antikörper.

7. Analyse des Retentionsverhaltens des Modellproteins IL-8-TAMRA in Papier

In Kapitel 5 und 6 wurde die Retention von Farbstoffmolekülen mit Papier während des kapillarkraftgetriebenen Fluidtransports untersucht. Es konnte gezeigt werden, wie durch die gezielte Variation/Modifikation der fluiden und soliden Phase die Farbstoffretention gesteuert werden kann. Dabei wurde das längerfristige Ziel verfolgt, papierbasierte POC-Devices besonders in Bezug auf die Aspekte der Sensitivität und Spezifität zu optimieren. Die Farbstoffexperimente dienten als Modellsystem. In diesem Kapitel soll nun mit gleicher Intention die Retention eines anwendungsnäheren Analyten, eines Proteins, untersucht werden.

Basierend auf den Ergebnissen der Farbstoffretentionsexperimente (Kapitel 5) und der in Rabe *et al.*^[114a] beschriebenen Einflüsse externer Parameter auf die Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen wurde erwartet, dass eine Variation der fluiden Phase hinreichende Möglichkeiten zur Regulierung der Retention von Proteinen liefert. Die Untersuchungen hierzu sind im ersten Abschnitt des nachfolgenden Kapitels beschrieben. Durch Modifikation mit Polymer und Rinderserumalbumin (BSA) wurde anschließend auch der Einfluss der Modifikation der soliden Phase Papier auf die Proteinretention untersucht. Zunächst wird jedoch das in dieser Arbeit verwendete Protein IL-8-TAMRA eingehender beschrieben.

Teile, der in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse, wurden bereits in der Bachelorarbeit von Frau Ursula Bärbel Menges^[133] veröffentlicht oder mit der Unterstützung der Praktikanten Markus Olschewski und Christian Benner angefertigt.

7.1. 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin-markiertes Interleukin-8 (IL-8-TAMRA) als Modellprotein

Aufgrund einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Schmitz an der TU Darmstadt fiel die Wahl des Modellproteins auf Interleukin-8 (IL-8). Die Literatur bekannten Charakteristika des Proteins wurden bereits in Abschnitt 3.2.4 vorgestellt. Für eine umfassende Beschreibung des Modellsystems soll in diesem Abschnitt ergänzend kurz auf die Oberflächenladung des Dimers sowie dessen Fluoreszenzmarkierung eingegangen werden.

Oberflächenladung des IL-8-Dimers

Rabe *et al.*^[114a] beschrieben einen Einfluss des pH-Werts auf den Ladungszustand von Proteinen. Folglich wurde die Oberflächenladung des IL-8-Dimers in Abhängigkeit des pH-Wertes genauer betrachtet. Dazu wurden die Oberflächenpotentiale mittels der Programme *pdb2pqr*^[162] und *APBS*^[163] berechnet und online mit dem javabasierten Graphikprogramm *Jmol*^[164] dargestellt (Abbildung 92). Es wurde deutlich, dass die Oberflächenladung des Dimers bei pH 3 noch vollständig positiv ist. Von pH 5 bis pH 9 wird sie immer schwächer. Zusätzlich entstehen auch negativ geladene Bereiche, die in der Abbildung rot gefärbt sind. Ab pH 11 schließlich ist die Proteinoberfläche vollständig negativ geladen.

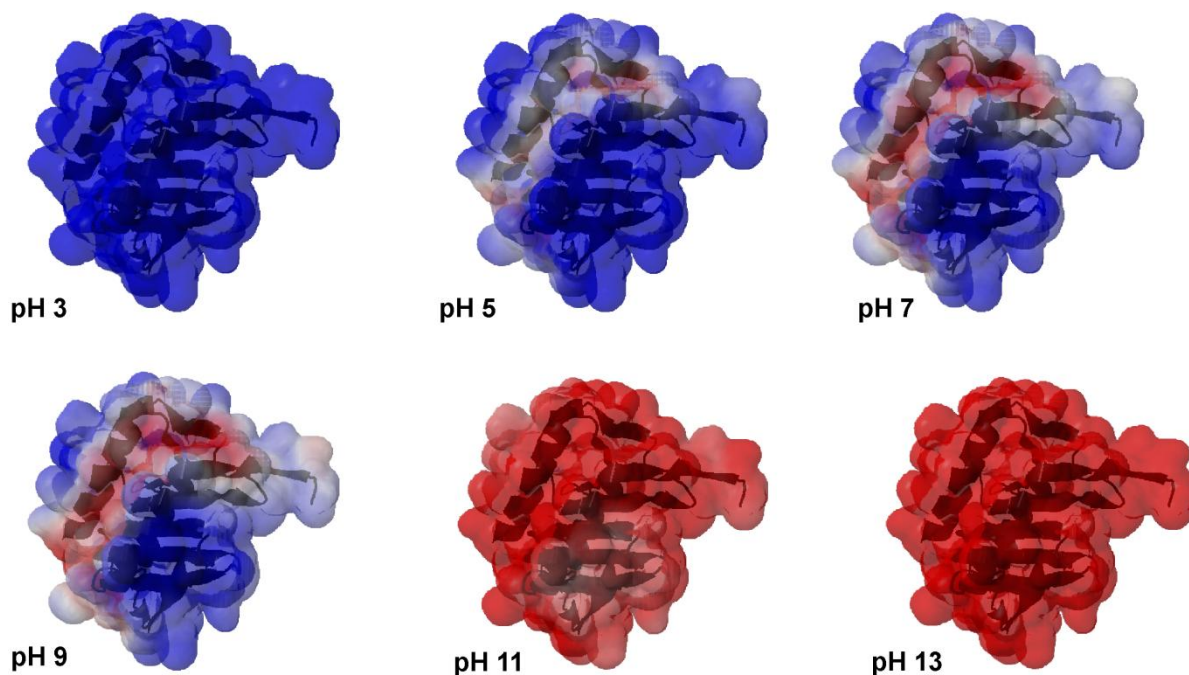


Abbildung 92: pH-abhängige Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche des IL-8-Dimers für die pH-Werte 3, 5, 7, 9, 11 und 13. Rot symbolisiert eine negative Ladung, Weiß eine neutrale und Blau eine positive Ladung. Das Oberflächenpotential wurde mittels `pdb2pqr`^[162] und `APBS`^[163] berechnet und online mit dem javabasierten Graphikprogramm `Jmol`^[164] dargestellt.

Fluoreszenzmarkierung von IL-8

Zur Analyse der Retention musste IL-8 in Papier detektierbar sein. Eine typische Methode zur visuellen Detektion ist die Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen. In dieser Arbeit wurde daher IL-8 mit Hilfe des Rhodaminderivats 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)^[165] markiert (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$; Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$ ^[166] in Methanol). Hierfür wurde die IL-8-Mutante IL-8 S72C verwendet, in der die 72. Aminosäure Serin durch ein Cystein ersetzt ist.^[167] Die so zusätzlich eingeführte Thiolgruppe ermöglichte über einen Linker eine Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs. In einer mehrstufigen, festphasenpeptidsynthesebasierten Kopplung wurde ein TAMRA-Molekül schließlich selektiv an Position 72 des Proteins gebunden.^[168] Das Produkt ist in Abbildung 93 dargestellt. Wie Vogler *et al.*^[114b] feststellten, ist allgemein wenig untersucht, inwiefern eine solche Markierung einen Einfluss auf die Adsorption von Proteinen nimmt, allerdings muss mit einem Einfluss gerechnet werden. Im Rahmen der Kooperation wurde IL-8-TAMRA von Kevin Brahm aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schmitz für die Untersuchung der Retention mit Papier zur Verfügung gestellt.

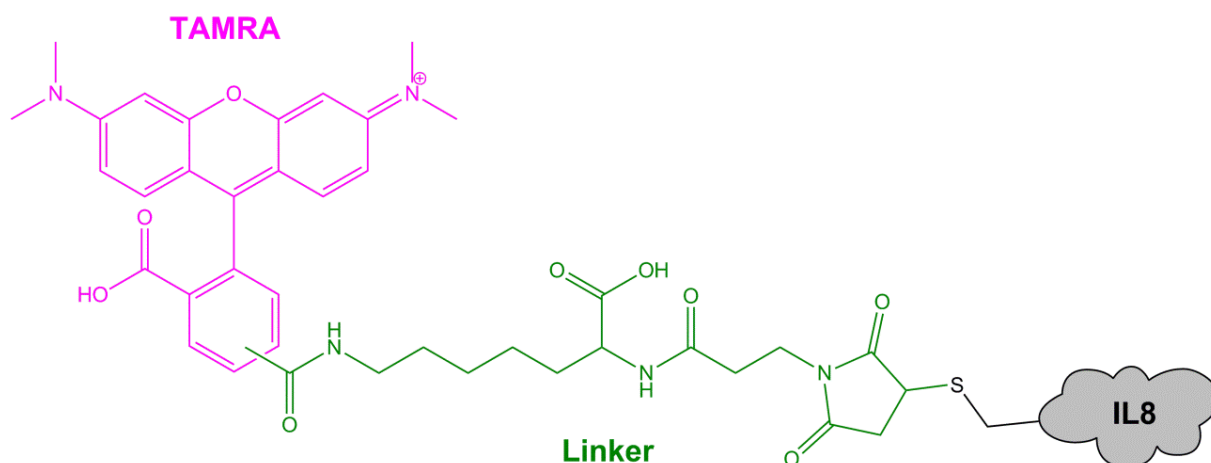


Abbildung 93: 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) (pink) ist mittels eines Linkers (grün) an den freien Cysteinrest der Interleukin-8 Mutante IL-8 S72C gekoppelt.

7.2. Retentionsverhalten in Abhängigkeit von der fluiden Phase

Im Folgenden wurde zunächst der Einfluss der fluiden Phase auf die Retention von IL-8-TAMRA in Papier untersucht. Dabei wurde neben dem pH-Wert und der Pufferart des wasserbasierten Fluids auch die Konzentration der Analytlösung variiert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten beschrieben. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Leitfähigkeit auf die Retention von IL-8-TAMRA untersucht. Bei diesen Untersuchungen musste allerdings festgestellt werden, dass das Verhalten nicht trivial zu erklären ist und umfassende Untersuchungen nötig sind, die für zukünftige Arbeiten angedacht wurden. Folglich finden sich die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen nur in Abschnitt 9.8.3. Schließlich wurden als Laufmittel auch Fluide mit verschiedenen Anteilen an organischen Lösungsmitteln untersucht. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 7.2.4 diskutiert.

Die Experimente wurden in mikrostrukturierten Papieren auf Basis von Baumwollintersfasern mit einem Flächengewicht von 45 g m^{-1} durchgeführt. Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben die angewendete Methodik zur Analyse der Retention in horizontalen (wasserbasierte Laufmittel) bzw. vertikalen (lösungsmittelbasierte Laufmittel) Systemen. Dabei wurde die Versuchsdurchführung für die Proteinretentionsexperimente im Vergleich zu den Farbstoffretentionsexperimenten leicht angepasst. Einerseits wurde die Laufzeit eines Experiments an Stelle der vom Fluid zurückgelegten Strecke fixiert, da Eukalyptussulfat- statt Baumwollinterszellstoff verwendet wurde. Andererseits wurde die Fehlerberechnung aufgrund der höheren Genauigkeit der Auswertung angepasst.

7.2.1. Wasserbasierte Fluide: Einfluss des pH-Werts

Zunächst wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Retention von IL-8-TAMRA in Papier untersucht. Dazu wurde der pH-Wert des Fluidreservoirs mit verschiedenen Puffersystemen zwischen pH 3 und pH 13 variiert (Details der Durchführung in Abschnitt 9.8.1). Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 94 exemplarisch Fluoreszenzaufnahmen von Retentionsexperimenten bei den verschiedenen pH-Werten dargestellt. Neben der pH-wertabhängigen Änderung der Laufweite des IL-8-TAMRAs verdeutlicht diese Abbildung, dass alle nach den Experimenten unter dem UV-Transilluminator betrachteten Proben eine Fluoreszenz am Ende der getrockneten Laufront des Fluides zeigten. Die Herkunft dieser Fluoreszenz war nicht bekannt und wurde daher in Abschnitt 9.8.2 untersucht. Zwar konnte nicht abschließend geklärt

werden, was die Fluoreszenz verursacht, allerdings konnte ausgeschlossen werden, dass sie mit den untersuchten Signalen interferiert. Vermutlich handelt es sich um ein wasserlösliches, im Baumwollinterspapier intrinsisch enthaltenes Molekül (Details in Abschnitt 9.8.2).

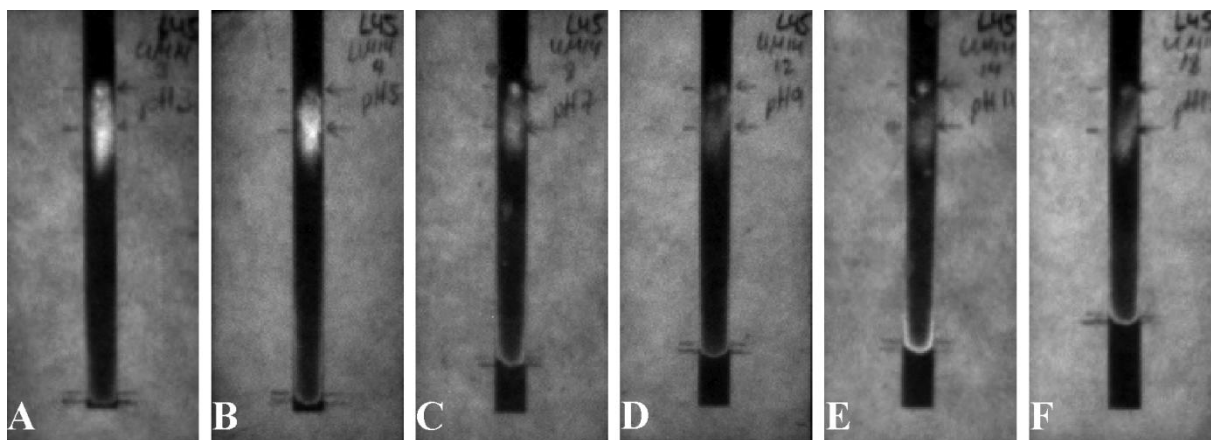


Abbildung 94: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der Retentionsexperimente für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) in Puffern bei pH 3, 5, 7, 9, 11, 13 als Laufmittel (von links nach rechts).^[133]

In Abbildung 95 ist der Retentionsfaktor in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen (Auswertung nach Abschnitt 3.3.1).

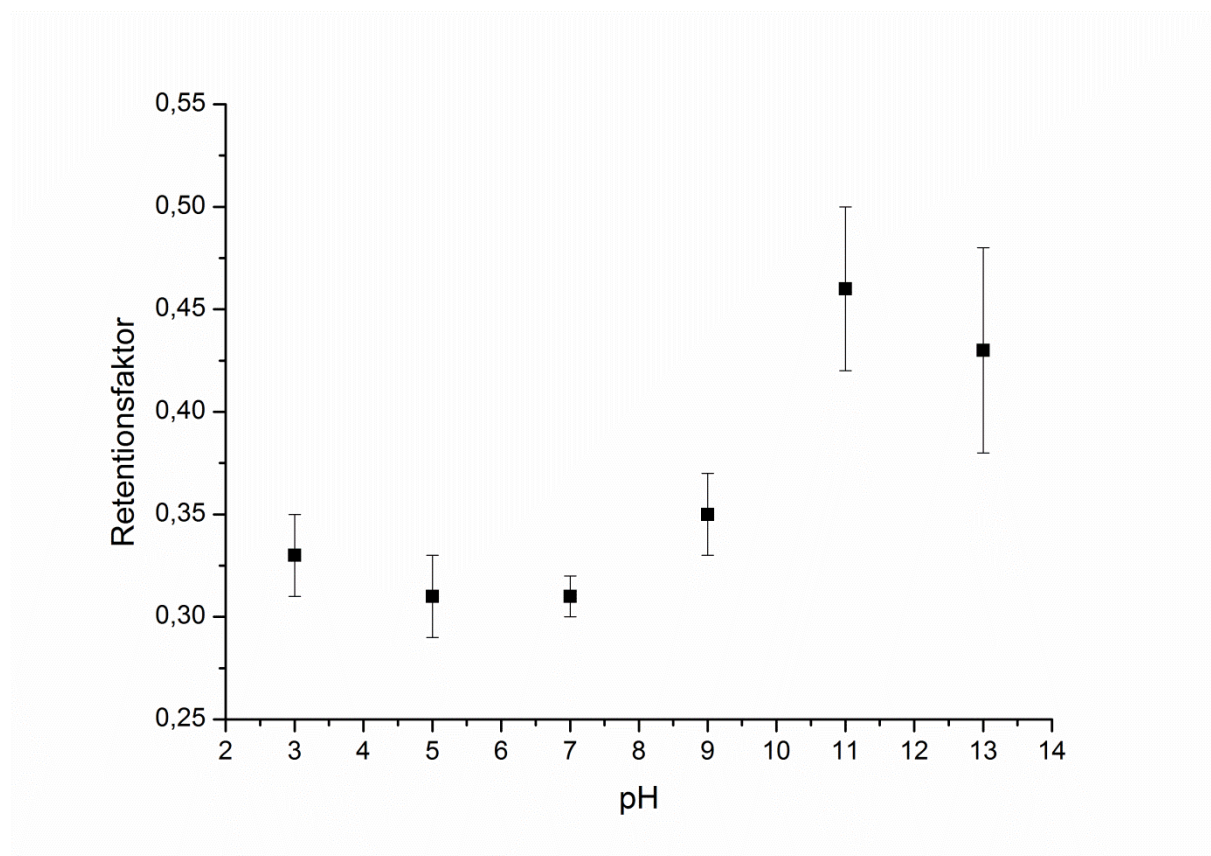


Abbildung 95: Retentionsfaktor als Funktion des pH-Wertes für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: verschiedene Puffer mit pH 3, 5, 7, 9, 11, 13. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

Es wurde beobachtet, dass der Retentionsfaktor im Rahmen der Fehler bis pH 9 annähernd konstant ist. Möglicherweise ist eine nicht signifikante Erhöhung bei pH 9 zu erkennen. Zwischen pH 9 und 11 stieg der R_F -Wert signifikant an, um für pH 13 im Rahmen der Fehler auf diesem höheren Niveau konstant zu bleiben. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den beschriebenen Änderungen der Oberflächenladung des Proteins in Abhängigkeit des pH-Wertes (Abschnitt 7.1), fiel eine Korrelation ins Auge. Die Oberflächenladung des IL-8-Dimers wechselte zwischen pH 9 und pH 11 von überwiegend positiv (blau) auf überwiegend negativ (rot) (Abbildung 92). Da Papier über den gesamten untersuchten pH-Bereich negativ geladen ist, konnte vermutet werden, dass die Retention des Proteins hauptsächlich auf den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Papier- und Proteinoberfläche beruhte. In diesem Fall waren Protein- und Papieroberfläche bis einschließlich pH 9 gegennamig und ab pH 11 gleichnamig geladen. Die daraus folgende verringerte Wechselwirkung ab pH 11 könnte der Grund für einen erhöhten Retentionsfaktor folglich eine geringere Retention sein. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass elektrostatische Wechselwirkungen als zentrale Einflussgröße der Wechselwirkung von Analyt und Papieroberfläche zu identifizieren sind. Somit konnte der gleiche Erklärungsansatz, der bereits für das Retentionsverhalten der Farbstoffe (Abschnitt 5.4) gültig war, auf das Retentionsverhalten des Proteins übertragen werden. Schließlich muss allerdings auch bedacht werden, dass andere Aspekte wie der hydrophobe Effekt oder Konformationsänderung durch die Wechselwirkung von IL-8-TAMRA mit Papierfasern oder den Einfluss des pH-Wertes (Abschnitt 3.2.3) eine Rolle spielen können.

Über den Retentionsfaktor hinaus wurden in diesem Experiment auch die Laufweite und die Bandenverbreiterung untersucht. Da die Ergebnisse allerdings wenig zum besseren Verständnis der Wechselwirkung des Proteins mit der Papieroberfläche beitragen, sind sie in Abschnitt 9.8.1 aufgeführt und sollen hier nur kurz erwähnt werden. Bei einer fixierten Experimentlaufzeit von 12 min nahm die Laufweite der Fluidfront mit steigendem pH-Wert ab. Die Bandenverbreiterung wies im Rahmen der Fehler über alle pH-Werte keine signifikante Abweichung von 1 auf. Das bedeutet, dass das Protein unabhängig vom pH-Wert relativ stark retentiert wurde.

7.2.2. Wasserbasierte Fluide: Einfluss der Pufferart

Puffer halten den pH-Wert einer Lösung auch bei Zugabe gemäßigter Mengen von Säure oder Lauge konstant. Besonders in der Biochemie sind Puffer sehr wichtig, da Proteine häufig anfällig auf eine pH-Wertänderung reagieren. Ein deutlich erhöhter oder verringerter pH-Wert kann zur Proteindenaturierung führen, sodass die Proteinfunktion deutlich beeinträchtigt oder vollständig unterbunden werden kann. Abhängig vom zu puffernden pH-Wertbereich und der Menge an zugegebener Säure bzw. Base müssen verschiedene Puffersysteme eingesetzt werden. Daher ist die Wahl des verwendeten Puffers meist anwendungsbezogen. Um die Anwendungsbreite von μ PADs mit verschiedenen Puffersystemen abschätzen zu können, soll im Folgenden der Einfluss der Pufferart auf die Retention eines Proteins betrachtet werden. Dazu wurden als Laufmittel vier verschiedene, in biochemischen Experimenten häufig angewendete Puffersysteme, verwendet: Puffer C (vom AK Schmitz üblicherweise für IL-8-TAMRA eingesetzt), Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-basierter Puffer), PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*) und HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-basierter Puffer) (Details zur Zusammensetzung in Abschnitt 9.8.4). Alle Puffersysteme wurden auf einen einheitlichen pH-Wert und eine einheitliche Leitfähigkeit eingestellt. Die verschiedenen Puffer wurden als Laufmittel eingesetzt. Der Puffer der aufgetragenen Proteinlösung konnte leider nicht variiert werden, da nicht

ausreichend Proteinmaterial zur Verfügung stand. Dennoch sollten die Untersuchungen brauchbare Ergebnisse liefern, da der bei der Auftragung des Analyten mit eingebrachte Puffer C schnell vom Laufmittelpuffer überlagert wird (Details der Durchführung in Abschnitt 9.8.4). In Abbildung 96 ist der Retentionsfaktor in Abhängigkeit der Pufferart aufgetragen (Auswertung nach Abschnitt 3.3.1).

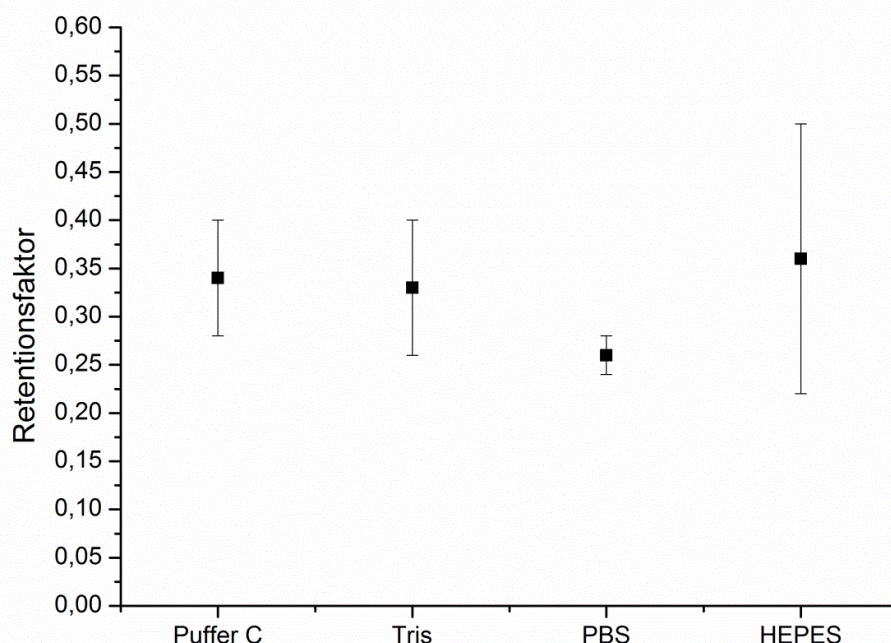


Abbildung 96: Retentionsfaktor als Funktion der Pufferart für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: Puffer C, Tris-Puffer, PBS-Puffer, HEPES-Puffer bei pH 7,4 und einer Leitfähigkeit von $18,37 \pm 0,04 \text{ mS cm}^{-1}$. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

Für die vier untersuchten Puffersysteme (Puffer C, Tris, PBS und HEPES) wurde kein Einfluss auf die Retention des Analyten IL-8-TAMRA beobachtet. Im Rahmen der Fehler lagen die Werte des Retentionsfaktors bei allen vier Puffersystemen im gleichen Wertebereich um 0,3. Dies entspricht auch den Ergebnissen in Abschnitt 7.2.1 im mittleren pH-Wertbereich. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf eine spätere Anwendung von μ PADs als positiv zu werten, denn der verwendete Puffer kann künftig ausschließlich abhängig von der geplanten Anwendung ohne experimentbedingte Einschränkungen gewählt werden. Allerdings müsste überprüft werden, ob dies auch für weitere Puffersysteme sowie für andere Proteine gilt, denn nach Rabe *et al.* ^[114a] und Vogler *et al.* ^[114b] wäre aufgrund unterschiedlichen Einflusses verschiedener Ionen auf geordnete Wasserstoffbrückenbindungen (chaotrope Wirkung), ein Einfluss der in der Lösung enthaltenen Ionenart auf die Wechselwirkung der Proteine mit einer Oberfläche zu erwarten. Jedoch scheint die Wechselwirkung von IL-8-TARMA mit der Papieroberfläche hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen geprägt zu sein. Eine Störung der geordneten Wasserstoffbrückenbindungen war folglich nicht entscheidend für die IL-8-TAMRA-Retention, sodass eine unterschiedliche chaotrope Wirkung keinen Einfluss hatte.

Über den Retentionsfaktor hinaus wurden auch in diesem Experiment die Laufweite und die Bandenverbreiterung untersucht (Auftragungen in Abschnitt 9.8.4). Eine im Rahmen der Fehler

konstante Laufweite und eine im Rahmen der Fehler maximale, konstante Bandenverbreiterung lieferte keine weiteren Erkenntnisse zur Wechselwirkung von IL-8-TAMRA mit Papier in Abhängigkeit der verschiedenen Puffersysteme.

7.2.3. Wasserbasierte Fluide: Einfluss der Proteinkonzentration

Es ist zu erwarten, dass zu analysierende Substanzen in biologischen Proben zwar in einem definierten unter Umständen aber weiten Konzentrationsbereich vorliegen können (Abschnitt 5.2.3). Häufig ist dieser zwar unbekannt jedoch nicht uninteressant. Daher entwickelten Cate *et al.*^[52] eine Methode, mit der die Konzentration des Analyten in der Probe anhand der Laufweite des Analyten in einem mikrostrukturierten Papiersubstrat bestimmt werden kann (Abschnitt 1.3). Beide Aspekte sind für die Optimierung von μ PADs von Interesse. Im folgenden Abschnitt wird daher zunächst der Einfluss der Proteinkonzentration auf dessen Retention untersucht. Anschließend wird im zweiten Teil versucht, den von Cate *et al.*^[52] beschriebenen Ansatz auf die Experimente zur IL-8-TAMRA-Retention in Abhängigkeit der Proteinkonzentration zu übertragen.

Retentionsexperimente wurden mit fünf verschiedenen Analytkonzentrationen ausgehend von der höchsten verfügbaren Konzentration von $7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, kontinuierlich abnehmend ($1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) durchgeführt (Details der Durchführung in Abschnitt 9.8.5). Geringere Konzentrationen ($\geq 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) konnten mit der beschriebenen Detektionsmethode nicht mehr analysiert werden. In Abbildung 77 ist der Retentionsfaktor in Abhängigkeit der Proteinkonzentration aufgetragen (Auswertung nach Abschnitt 3.3.1).

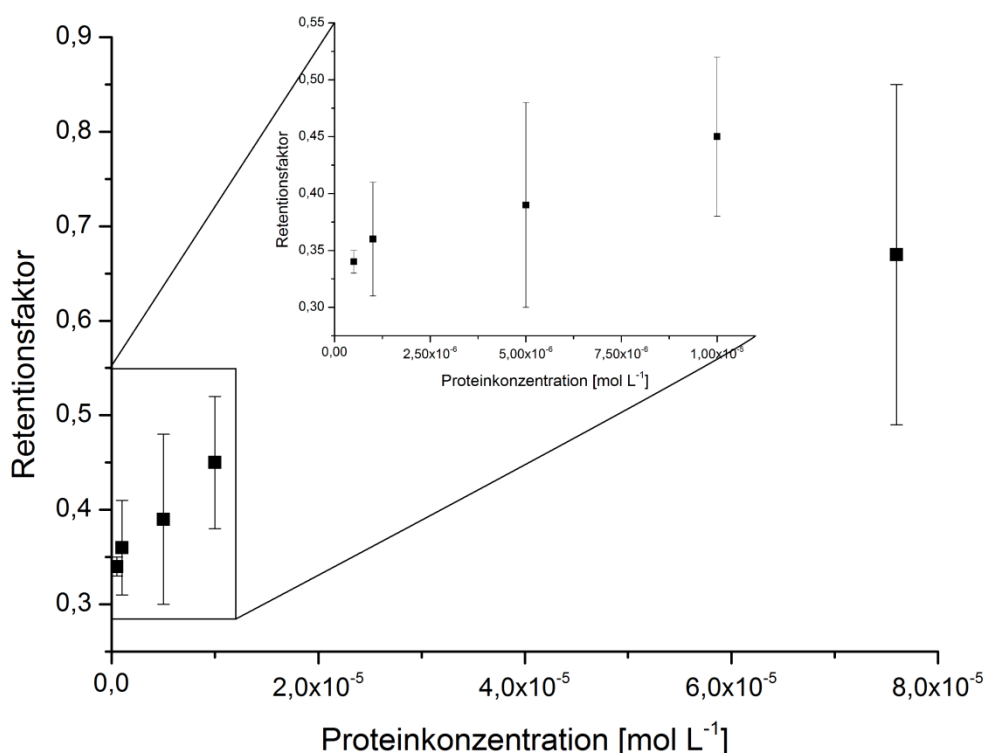


Abbildung 97: Retentionsfaktor als Funktion der Proteinkonzentration für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung verschiedener Konzentrationen ($7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

Abbildung 97 zeigt eine Zunahme des Retentionsfaktors mit zunehmender Proteinkonzentration. Mikroskopisch betrachtet könnte dies äquivalent zu Methylenblau (Abschnitt 5.2.3) erklärt werden. Nach Rabe *et al.*^[114a] und Nakanishi *et al.*^[114c] lagern sich Proteine an Oberflächen abhängig von ihren Eigenschaften in Mono- oder Multilag an. In beiden Fällen wurde allerdings in der Literatur beschrieben, dass oberhalb einer bestimmten Konzentration eine Sättigungsbedeckung erreicht wird. Ist diese Konzentration erreicht, können im gleichen Oberflächenbereich keine zusätzlichen Proteinmoleküle mehr angelagert werden, da alle Adsorptionsplätze belegt sind. Dies führt bei höheren Proteinkonzentrationen dazu, dass nicht mehr alle Proteinmoleküle direkt mit der Papieroberfläche entsprechend ihrer Eigenschaften wechselwirken können. Diese Proteine werden durch den mikrofluidischen Fluss weitertransportiert bis sie einen Kanalbereich erreichen, in dem die Sättigungsbedeckung der Papieroberfläche noch nicht erreicht ist. So gelangen Proteinmoleküle in Bereiche des Papierkanals, die weiter vom Auftragungsort entfernt liegen, als es die direkte Proteinwechselwirkung mit der Papieroberfläche erwarten ließe. Makroskopisch resultiert dies in einem höheren Retentionsfaktor. Auf die Art der Wechselwirkung konnte in diesem Experiment allerdings nicht direkt rückgeschlossen werden. Eine elektrostatische Wechselwirkung wäre möglich, denn bei pH 7,4 überwiegend positiv geladen, könnte das Protein an der bei diesem pH-Wert negativ geladenen Papieroberfläche reternieren. Allerdings könnten auch andere Adsorptionsarten diese Beobachtungen erklären.

Aus den Beobachtungen dieses Experiments lassen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen. Zunächst sollte für Retentionsexperimente eine möglichst geringe Proteinkonzentration verwendet werden, um unverfälscht von der Sättigungsbedeckung der Oberfläche die Wechselwirkung von Protein und Papier zu untersuchen. Die geringste Konzentration, die dennoch unter beschriebenen Bedingungen (Abschnitt 3.3.1) gut zu detektieren war, lag bei $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Folglich wurde diese Konzentration als Standardkonzentration in allen Proteinexperimenten gewählt. Darüber hinaus könnte das beschriebene Experiment nach dem Ansatz von Cate *et al.*^[52] möglicherweise als Kalibrierungsgerade für die Bestimmung der Konzentration einer unbekannten Probe genutzt werden. Dieser Ansatz wurde überprüft.

Berechnung der Analytkonzentration der Probe anhand des Retentionsfaktors

Um den Ansatz von Cate *et al.*^[52] zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe anhand des Retentionsfaktor zu überprüfen, wurde der Logarithmus der Proteinkonzentration gegen den Retentionsfaktor aufgetragen. Da angenommen werden kann, dass bei der höchsten verwendeten Konzentration von $7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ die Sättigungsbedeckung überschritten ist, wurde diese Konzentration in der Auftragung vernachlässigt. Nach dem Ansatz von Cate *et al.*^[52] ergab sich durch eine Regression dieser Daten eine Geradengleichung, die zur Bestimmung von unbekannten Konzentrationen einer Probe als Kalibrierungsgerade genutzt werden kann. Abbildung 98 zeigt, dass die Durchführung einer linearen Regression zu einer Gerade (Gleichung 23) mit einem Regressionsfaktor von 0,93 führte.

$$y = 0,8079 + 0,0743 x \quad (23)$$

Eine Linearität war aufgrund des geringen Regressionsfaktors nur bedingt nachzuweisen. Dennoch lag die Regression innerhalb des Fehlerbereichs der einzelnen Datenpunkte. Daher wurde versucht, die Regressionsgerade als Kalibrierungsgerade für ein Experiment anzuwenden. Folglich wurde Gleichung 23 nach x umgestellt (Gleichung 24), bevor der R_F -Wert für y bzw. der dekadischen

Logarithmus der Konzentration ($\log(c)$) für x eingesetzt wurde (Gleichung 25). So konnte die Konzentration der Analytlösung direkt mittels des Retentionsfaktors berechnet werden.

$$x = \frac{y - 0,8079}{0,0743} \quad (24)$$

$$c = 10^{\frac{R_f - 0,8079}{0,0743}} \quad (25)$$

In Abschnitt 7.3.1 (Referenz) wurde unter den gleichen Bedingungen, die zur Ermittlung der Kalibrierungsgerade verwendet wurden (Puffer C, pH 7,4), für eine Probenkonzentration von $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ein Retentionsfaktor von 0,31 ermittelt. Wurde anhand von Gleichung 25 die Konzentration der eingesetzten Analytlösung anhand des gemessenen Retentionsfaktor berechnet, ergab sich ein Wert von $1,99 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Dieser Wert lag um etwa eine Zehnerpotenz neben der tatsächlich eingesetzten Proteinkonzentration. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass der Ansatz von Cate *et al.*^[52] grundsätzlich für diesen Experimenttyp angewendet werden kann. Eine genauere Kalibrierungsgerade, die zu noch exakteren Ergebnissen führen würde, könnte durch einerseits mehr Datenpunkte und andererseits kleineren Fehlern der ermittelten Werte realisiert werden.

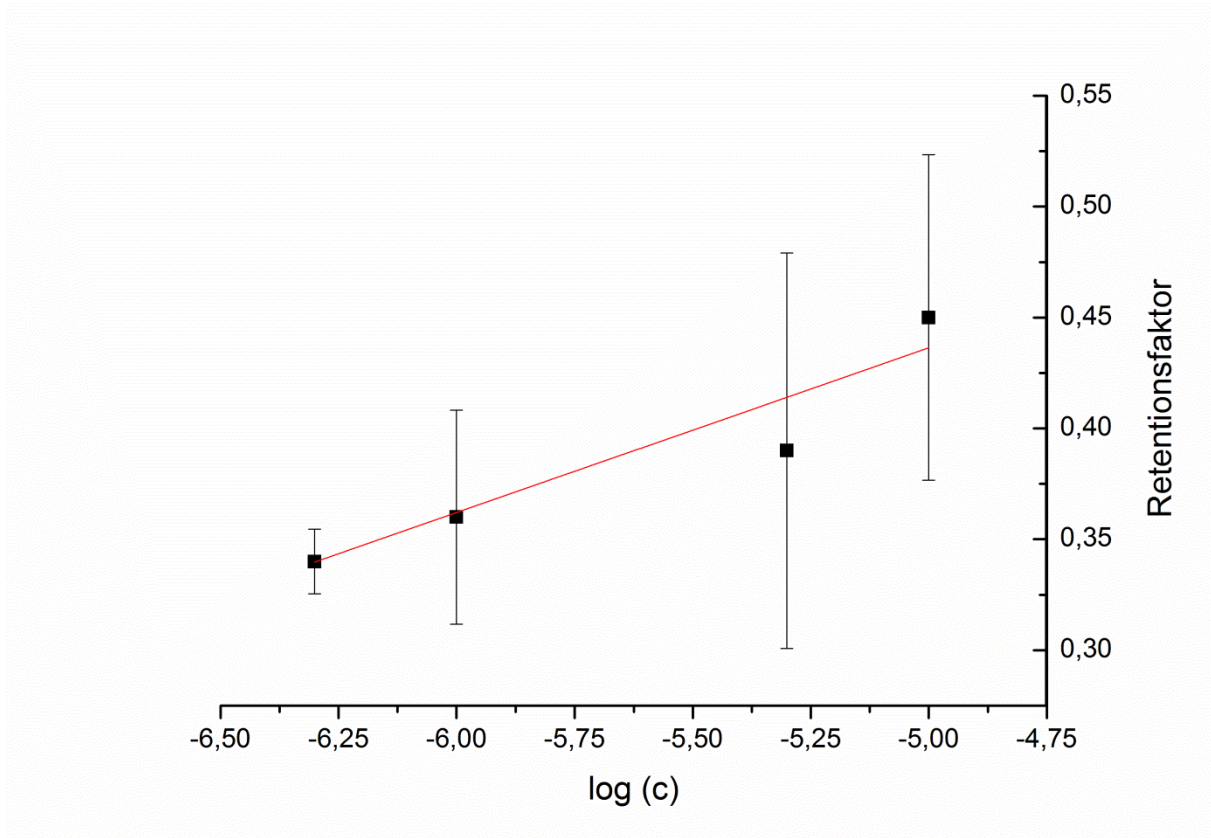


Abbildung 98: Retentionsfaktor als Funktion des dekadischen Logarithmus der Proteinkonzentration für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung in Puffer C bei verschiedenen Konzentrationen ($1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwolllinters.

7.2.4. Lösungsmittelbasierte Fluide

In Abschnitt 7.2 wurden verschiedene Möglichkeiten zur Steuerung der Retention durch die Variation wasserbasierter Fluide untersucht. Eine Möglichkeit, die Retention von IL-8-TAMRA in Papier deutlich zu verringern, konnte dabei allerdings nicht gefunden werden.

Da eine Steuerung der Retention über einen möglichst umfassenden Bereich für eine Verbesserung von μ PADs allerdings erstrebenswert ist, wurde ein alternativer Ansatz zur Verringerung der Retention gesucht. Die Idee, das Fluid mit unterschiedlichen Anteilen verschiedener organischer Lösungsmittel als Laufmittel zu versetzen, wurde als Nächstes verfolgt.

Auswahl der Lösungsmittel

Problematisch bei der Verwendung von organischen Lösungsmittel mit Proteinen ist das Risiko der Denaturierung der Proteine. Somit war zunächst die Auswahl der zu untersuchenden Lösungsmittel von zentraler Bedeutung. Primär wurden Lösungsmittel ausgewählt, die in der Biochemie im Zusammenhang mit Proteinen und Peptiden häufig Anwendung finden. Die folgenden Lösungsmittel wurden als Laufmittel ausgewählt:

- **Puffer C:** Als wasserbasierte Referenz in der IL-8-TAMRA üblicherweise verwendet wird (Abschnitt 7.2).
- **30 % Acetonitril (ACN) in Wasser:** Zur Aufreinigung von Peptiden dient häufig 30% Acetonitril in Wasser als Eluent einer präparativen RP-HPLC.
- **20 % Ethanol (EtOH) in Wasser & Methanol: Essigsäure (50:50) Gemisch (MeOH:ES):** Wasser, Essigsäure und Methanol/Ethanol in verschiedenen Zusammensetzungen werden üblicherweise zur Entfärbung von coomassiegefärbten Gelen verwendet.^[169] Eine sehr milde Zusammensetzung (EtOH/Wasser) und eine harsche Zusammensetzung (MeOH/ES) wurden untersucht. Bei der Auswahl wurde berücksichtigt, dass IL-8 nach Literatur relativ pH-stabil ist.^[122]
- **Dimethylformamid (DMF):** DMF wurde als häufig in der Peptidsynthese eingesetztes Lösungsmittel ausgewählt.^[170]

Trotz der häufigen Verwendung mit Proteinen ist nicht sicher, dass IL-8-TAMRA in diesen Lösungsmitteln nativ vorliegt. Dies könnte durch CD-Spektroskopie untersucht werden. Allerdings war dies nicht möglich, da IL-8-TAMRA nur in begrenztem Maß zur Verfügung stand.

Untersuchung der Retention im vertikalen System

In einem Vorexperiment wurde die Stabilität der photolithographischen Mikrostrukturierung (vgl. Abschnitt 9.8.6) gegen verschiedene lösungsmittelbasierte Fluide untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Ergebnisübersicht zu Experimenten der Barrierestabilität der P(S-co-MABP-co-PyMA)-Barrieren gegen verschiedene Lösungsmittel.

Lösungsmittel	Barrierestabil?
Puffer C	ja
30 % Acetonitril in Wasser	nein
20 % Ethanol in Wasser	ja
Methanol: Essigsäure (50:50)	nein
DMF	nein

Aufgrund mangelnder Stabilität der photolithographischen Mikrostrukturierung gegen eine Vielzahl der untersuchten Lösungsmittel(gemische) erfolgten die Retentionsexperimente mit lösungsmittelbasierten Fluiden im vertikalen System (Details der Durchführung und Auswertung in Abschnitt 3.3.2 und 9.8.6). Die Ergebnisse sind in Abbildung 99 und Abbildung 100 aufgetragen.

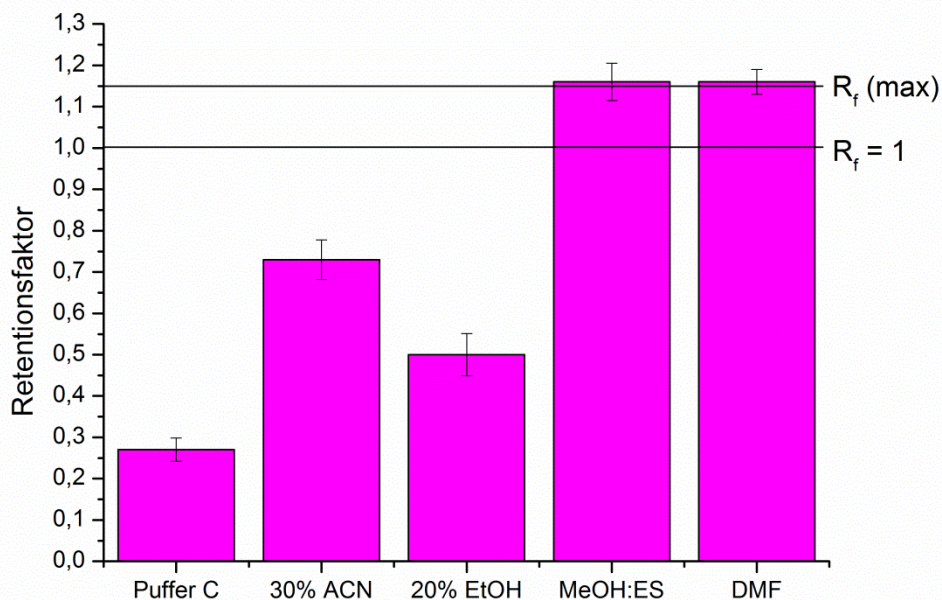


Abbildung 99: Retentionsfaktor einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) im vertikalen System mit verschiedenen Laufmitteln. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwolllinters. Die schwarze Linie symbolisiert den rechnerisch maximal möglichen Retentionsfaktor.

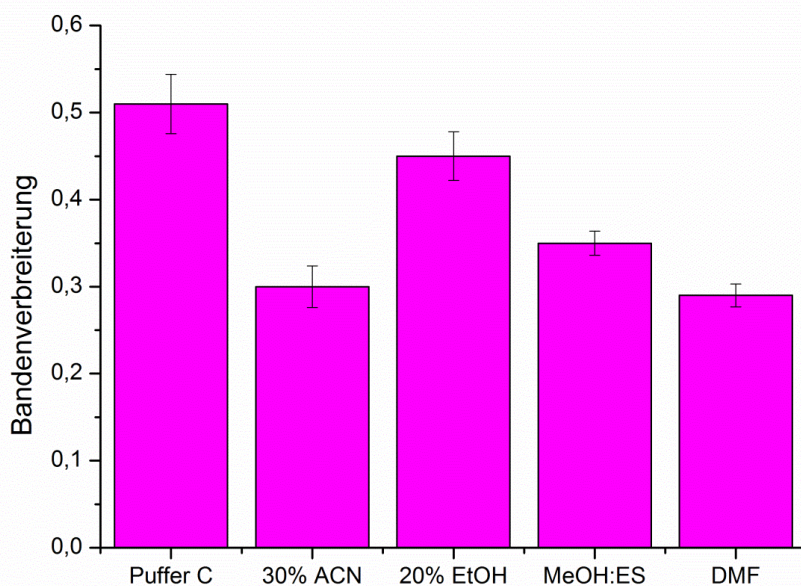


Abbildung 100: Bandenverbreiterung einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) im vertikalen System mit verschiedenen Laufmitteln. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwolllinters.

Ein im Rahmen der Fehler maximaler Retentionsfaktor und eine sehr geringe Bandenverbreiterung verdeutlichten, dass sowohl für das Gemisch von Methanol und Essigsäure als auch für DMF eine sehr geringe Retention zu beobachten war. Das Ziel einer möglichst geringen IL-8-Retention in Papier als Ausgangspunkt für eine Optimierung der μ PADs erfüllen diese beiden Lösungsmittel folglich gut.

Das anteilige Ersetzen von Wasser durch Ethanol oder Acetonitril im Laufmittel führte im Vergleich zum vollständig wasserbasierten Puffer C zu einem deutlich erhöhten Retentionsfaktor. Die Bandenverbreiterung war gleichzeitig vor allem für das Acetonitril-Wasser-Gemisch im Vergleich zu Puffer C reduziert. Dies wies, wie angestrebt, auf eine Verringerung der Retention von IL-8-TAMRA in Papier im Vergleich zu Puffer C als Laufmittel hin. Allerdings fiel sie nicht so deutlich aus, wie für das Methanol/Essigsäure-Gemisch und DMF beobachtet.

Ein Grund für das sehr unterschiedliche Retentionsverhalten könnten Denaturierung oder Konformationsänderungen des Proteins in verschiedenen Lösungsmitteln sein. Beispielsweise liegt die Vermutung nahe, dass IL-8-TAMRA in DMF und MeOH:ES denaturiert wird, da es sich für ein Protein dabei um eine harsche Umgebung handelt. Der Verlust der Struktur führt zu anderen funktionellen Gruppen und folglich Wechselwirkungsmöglichkeiten der Proteinoberfläche mit dem Substrat. Es könnte auch zu einer Änderung der Proteinform, die die Wechselwirkung mit der Papieroberfläche und so die Retention beeinflussen, kommen. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass durch die Änderung der Polarität des Lösungsmittels Effekte wie elektrostatische Wechselwirkungen oder der hydrophobe Effekt, die bei der Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen eine große Rolle spielen (Abschnitt 3.2.3), beeinflusst werden.

Das Lösungsmittel mit der geringsten Retention und einer nativen Proteinstruktur könnte für eine Optimierung der μ PADs am besten genutzt werden. Besonders interessant wäre zu untersuchen, ob die Retention durch die Variation des Anteils eines organischen Lösungsmittels stufenlos gesteuert werden kann. Vorausgesetzt IL-8-TAMRA liege in diesem Fall in allen Verdünnungsstufen nativ vor, wäre dies eine optimale Möglichkeit zur Regulation der Retention von IL-8 oder auch anderer Proteine in μ PADs.

7.3. Retentionsverhalten in Abhängigkeit von Substratmodifikationen

Alternativ zur Variation des Laufmittels sollte auch der Einfluss der Modifikation der Substratoberfläche auf die Retention von IL-8-TAMRA in Papier untersucht werden. Ziel war auch in diesem Fall die Reduktion der Retention gegenüber der unmodifizierten Papieroberfläche. Zwei verschiedene Ansätze, die Modifikation der Papieroberfläche mit einem Polymer (PDMAA) und mit einem anderen Protein (BSA), wurden untersucht.

7.3.1. Modifikation der Substratoberfläche mit P(DMAA-co-MABP)

Khan *et al.*^[116] beschrieben verschiedene Polymere, die physisorbiert an Papier die Retention von Alkalischer Phosphatase reduzieren. Diesen Ansatz aufgreifend, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von kovalent an Papierfasern gebundenem PDMAA untersucht. PDMAA gilt in der Literatur als ein proteinabweisendes^[117, 171], ungiftiges^[117a], biokompatibles und unter biologischen Bedingungen stabiles^[172] Polymer. Diese Eigenschaften machen es für den Einsatz zur Reduktion der Retention von Proteinen in μ PADs interessant.

Um den Einfluss der Modifikation der Papieroberfläche mit diesem Polymer auf die Proteinretention zu untersuchen, wurden zunächst mikrostrukturierte Papiersubstrate hergestellt (Abschnitt 9.5.1).

In einem zweiten Schritt (Abschnitt 9.5.2) wurden diese Kanäle mit P(DMAA-co-MABP)-Polymer mit zwei verschiedenen Ausgangskonzentrationen der Applikationslösungen ausgekleidet. Anschließend wurde in Retentionsexperimenten der Einfluss der Modifikation auf die Laufweite der Fluidfront sowie auf den Retentionsfaktor und die Bandenverbreiterung des IL-8-TAMRA untersucht (Durchführung nach Abschnitt 9.8.7). In Abbildung 101 sind die drei untersuchten Parameter in Abhängigkeit der Polymerkonzentration aufgetragen.

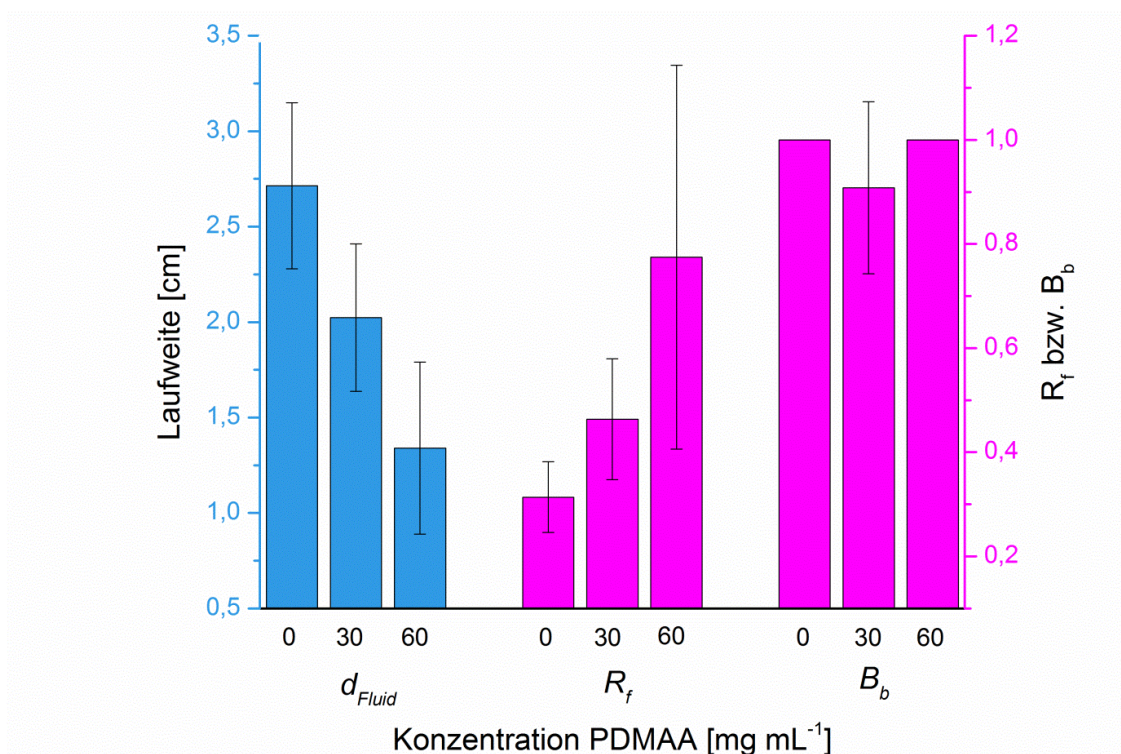


Abbildung 101: Laufweite des Fluids, Retentionsfaktor und Bandenverbreiterung für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration der P(DMAA-co-MABP)-Lösung ($c = 0, 30, 60$ mg mL⁻¹). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. Papiersubstrat: 45 g m⁻² Baumwolllinters.

Es fiel auf, dass die Laufweite des wasserbasierten Fluids (Puffer C) mit zunehmender Polymerkonzentration abnimmt. Wie auch bereits Songok *et al.*^[145] beobachteten, beeinflusste eine ansteigende Hydrophobizität der Papieroberfläche, in diesem Fall durch das aufgebrachte Polymer, die Oberflächenenergie. Dies bedingte eine Verlangsamung des Fluidtransports (Abschnitt 3.1.4). Der Retentionsfaktor zeigte eine, aufgrund der großen Fehler allerdings nicht signifikante, Zunahme mit zunehmender Polymerkonzentration. Die PDMAA-Beschichtung schien die Retention aufgrund der proteinabweisenden Eigenschaften also, wenn auch nicht signifikant, zu verringern. Interessant wäre zu betrachten, inwiefern diese Beobachtung möglicherweise mit der verringerten Laufweite zusammenhängt.

Die Bandenverbreiterung blieb im Rahmen der Fehler auch bei zunehmender Polymerkonzentration konstant. Die proteinabweisenden Eigenschaften des Polymers kamen möglicherweise aufgrund einer zu geringen Konzentration im Papierfasernetzwerk nicht deutlich genug zum Tragen, um eine Retention zu verhindern. Die deutliche Zunahme der Fehlerbalken bei höherer Polymerkonzentration könnte darin begründet liegen, dass die Oberflächenstruktur der Kanäle durch die Einbringung des Polymers uneinheitlicher werden.

7.3.2. Modifikation der Substratoberfläche mit BSA

Der zweite Ansatzpunkt zur Reduktion der oberflächenbedingten Retention von Proteinen in Papier basiert auf der vorherigen Blockierung von Bindungsstellen mit einem anderen Protein. Dies ist eine typische Herangehensweise in der Biochemie^[173] und wird z.B. bei *Lateral Flow Immunoassays*^[5] oder bei *ELISA-Assays*^[174] angewendet. Als Protein wird häufig Rinderalbumin (BSA) verwendet. BSA ist ein traditionelles *blocking agent* zur Verhinderung unspezifischer Wechselwirkungen von Proteinen mit hydrophilen und hydrophoben Oberflächen.^[173] Auch die Anwendung in Papier ist bereits bekannt.^[8-9] Nach Jeyachandran *et al.*^[173] adsorbiert es an geladene Oberflächen durch elektrostatische Wechselwirkungen, die durch Denaturierung maximiert und durch einfaches Waschen mit Puffer nicht mehr gebrochen werden.

Die Blockierung der Adsorptionsstellen in zuvor mikrostrukturierten Papiersubstraten erfolgte klassisch durch *Dipcoating* (Details der Durchführung in Abschnitt 9.8.8). Anschließend wurde in Retentionsexperimenten anhand von Retentionsfaktor und Bandenverbreiterung untersucht, inwiefern die Blockierung der Adsorptionsstellen einen Einfluss auf die Retention von IL-8-TAMRA in Papier hat (Durchführung und Auswertung nach Abschnitt 3.3.1). In Abbildung 102 sind Retentionsfaktor und Bandenverbreiterung einer Referenzprobe und einer im Vorhinein mit BSA behandelten Probe dargestellt.

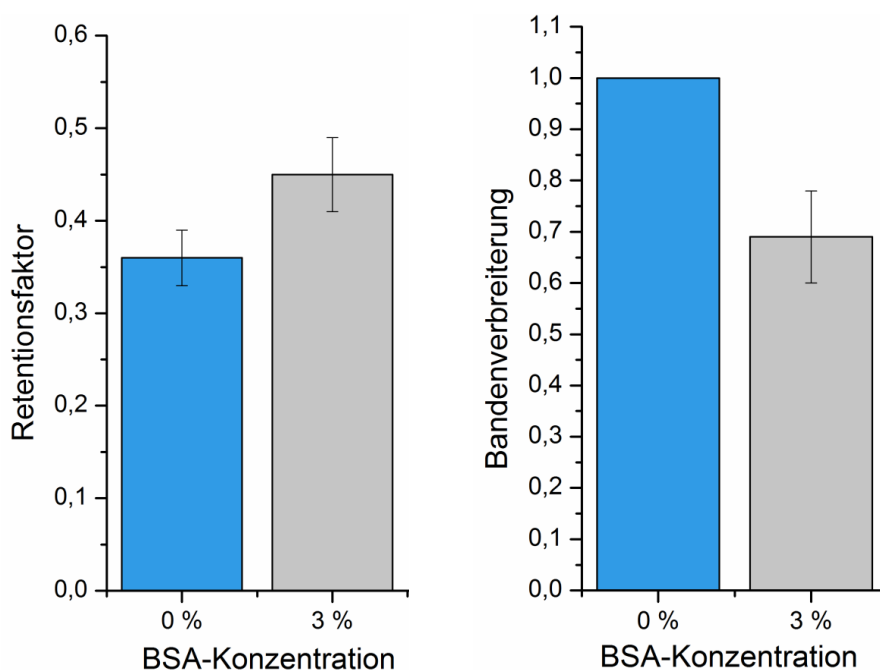


Abbildung 102: Retentionsfaktor und Bandenverbreiterung für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) in Abhängigkeit der Konzentration der BSA-Lösung während der Kanalbeschichtung ($c = 0,3 \text{ wt-\%}$). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwolllinters.

Es muss erwähnt werden, dass die Modifikation der Paperoberfläche offensichtlich einen deutlichen Einfluss auf die Fluidgeschwindigkeit hat. Dies könnte mit einer Änderung der Oberflächenenergie durch das adsorbierte Protein begründen werden, hatte aber zur Folge, dass die Laufzeit der Experimente angepasst werden musste. Im Gegensatz zu der in Abschnitt 3.3.1 allgemein beschriebenen Durchführung der Proteinretentionsexperimente liefen die Experiment in diesem Abschnitt 8 min statt 12 min.

Der Retentionsfaktor nahm im Vergleich zur Referenz durch die Modifikation der Paperoberfläche mit BSA leicht, aber nicht signifikant, zu, während die Bandenverbreiterung leicht abnahm. Dies lässt den Schluss zu, dass die Retention etwas, allerdings deutlich weniger als erwartet, abnimmt. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass nach Eckes *et al.*^[129] eine unspezifische Wechselwirkung von BSA und IL-8 existiert. Diese könnte bei pH 7,4 auf der elektrostatischen Wechselwirkung von negativ geladenem BSA ($pI < 7,4$)^[175] und positiv geladenem IL-8 ($pI > 7,4$)^[125-126] basieren. So könnte der Effekt des Blockierens von Absorptionsstellen direkt durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Proteinen nihilisiert werden.

Literaturstellen zur Adsorption von IL-8 an durch Albumin blockierten Oberflächen sind sehr widersprüchlich. Während Hei *et al.*^[123] beschrieben, dass menschliches Serumalbumin in Lösung die Adsorption von IL-8 an Silicaoberflächen steigert, fanden Lee *et al.*^[128] heraus, dass fötales Rinderserum (das Albumin enthält) die Adsorption an Siliziumnanopartikeln reduziert. Eine allgemeine Beurteilung über die Effektivität der Modifikation der Paperoberfläche mit BSA zur Reduktion der Retention von IL-8 auf Papier war folglich schwierig.

7.4. Fazit

Ziel des letzten Abschnitts dieser Dissertation war die Erarbeitung eines besseren Verständnisses der Retention des Modellanalyten IL-8-TAMRA in Papier. Dafür wurde, wie bereits für Farbstoffe in Papier (Kapitel 5), zunächst von den drei allgemein definierten Einflussgrößen auf die Wechselwirkung von Analyten mit einem Papiersubstrat ausgegangen: Größenausschluss, selektive Adsorption/Chromatographie und Ionenaustausch (ionische Wechselwirkung).^[6]

Der **Größenausschluss** kann vermutlich wie zuvor schon für Farbstoffmoleküle vernachlässigt werden. Zwar ist der Stokesradius für IL-8-TAMRA nicht Literatur bekannt, allerdings ist das fast achtmal so schwere Protein BSA (65.000 Da) mit einem Stokesradius von 3,48 nm^[173] immer noch deutlich kleiner als der typische Durchmesser der Papierporen von 4–16 μm (Abschnitt 4.4.2). Folglich kann zumindest für nicht sehr stark fibrillierte Faserstoffe davon ausgegangen werden, dass der Größenausschluss bei der Retention von IL-8-TAMRA keine Rolle spielt.

Für eine Untersuchung von **Adsorption und elektrostatischer Wechselwirkung** als Einflussgrößen der Proteinretention müssten zunächst die Eigenschaften des Proteins genauer betrachtet werden. Nach der Definition von Nakanishi *et al.*^[114c] kann IL-8 als kleines, konformell stabiles Protein zur Gruppe der "harten" Proteine zugeordnet werden. Folglich ist der Wechselwirkung mit einer Oberfläche aufgrund von Konformationsänderungen vermutlich eher weniger Gewicht beizumessen. Da das hydrophile Protein IL-8 mit der hydrophilen Paperoberfläche wechselwirkt, ist zu erwarten, dass auch der hydrophobe Effekt nur eine untergeordnete Rolle spielt. Da jedoch Protein (Abschnitt 7.2) und Paperoberfläche (Abschnitt 4.3) geladen sind, ist vermutlich die elektrostatische Wechselwirkung zwischen beiden der entscheidende Parameter bei der Beurteilung der Wechselwirkung und damit der Retention (Abschnitt 3.2.3).

Diese Vermutung ließ sich vor allem durch die Ergebnisse der Experimente zur Proteinretention bei verschiedenen **pH-Werten** bestätigen. Hier korrelierte die Änderung der Oberflächenladung des Proteins direkt mit der Änderung der Retention (Abschnitt 7.2.1). Damit waren die Ergebnisse auch kongruent mit den Erkenntnissen aus den Farbstoff-Modellexperimenten. Positiv konnte festgehalten werden, dass die untersuchten **Puffersysteme** (Puffer C, PBS, Tris, HEPES) keinen Einfluss auf die Retention von IL-8-TAMRA zeigten (Abschnitt 7.2.2). Dies wies ebenfalls auf einen verstärkten Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung im Gegensatz zu z.B. dem hydrophoben Effekt hin (Abschnitt 5.2.1), da eine Störung der Wasserstoffbrücken durch unterschiedliche

chaotrope Wirkung der Ionen in den Puffern offenbar keine Wirkung hat. Vor allem für spätere Anwendungen ist dieses Ergebnis von Vorteil, da der verwendete Puffer so ausschließlich abhängig von der geplanten Anwendung ohne experimentbedingte Einschränkungen gewählt werden kann. Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der **Proteinkonzentration** unterstützen die Vermutung, dass die Elektrostatik eine entscheidende Rolle in der Wechselwirkung von Analyt und Papieroberfläche spielt (Abschnitt 7.2.3). Äquivalent den Schlussfolgerungen aus Abschnitt 5.2.3 für Methylenblau wurde festgestellt, dass eine Überladung des μ PADs aufgrund einer zu hohen Analytkonzentration ($c = 7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) zu einer Verfälschung des Retentionsfaktors führte. Bei einer zu hohen Zahl Analyte kann nicht die direkte Wechselwirkung von Analyt und Papieroberfläche beobachtet werden. Bei einer mittleren Konzentration ($1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} - 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) kann vermutet werden, dass der Retentionsfaktor hauptsächlich durch die Adsorption der Proteine definiert ist, die u.a. durch elektrostatische Wechselwirkungen begründet sein kann. Sehr geringe Proteinkonzentrationen ($\geq 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) konnten mit der verwendeten Detektionsmethode nicht analysiert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte das Modell von Cate *et al.*^[52] auf die durchgeführten Experimente angewendet werden. Innerhalb der ermittelten Konzentrationsgrenzen ($1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} - 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) konnte exemplarisch ein Retentionsfaktor zur Bestimmung der unbekannten Proteinkonzentration einer Probe genutzt werden. Das Ergebnis war bis auf eine Zehnerpotenz genau, könnten aber durch eine Optimierung der Kalibrationsgerade verbessert werden.

Neben wasserbasierten Fluiden wurden auch **Fluide mit organischen Anteilen** untersucht (Abschnitt 7.2.4). Diese führten zu einer durchschnittlich deutlich geringeren Retention von IL-8-TAMRA in Papier als wasserbasierte Fluide. Erklärungsansätze für diese Beobachtung könnten Denaturierung oder Konformationsänderungen des Proteins oder veränderte Wechselwirkungsmechanismen durch die Änderung der Polarität des Laufmittels sein. Die Erklärungsansätze müssten durch weitere Experimente, z.B. CD-spektroskopische Untersuchungen der Proteinstruktur in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, überprüft werden.

Die **Modifikation der soliden Phase** Papier mit Polymer und BSA (Abschnitt 7.3) zeigt, dass beide Modifikationsoptionen eine leichte, wenn auch aufgrund großer Fehler wenig signifikante Erhöhung des Retentionsfaktors verglichen zur Referenz boten. Eine Steuerung der Retention war durch die Modifikation des Substrates Papier folglich nur in begrenztem Rahmen möglich. Erfolgsversprechender und zusätzlich weniger aufwändig scheint somit basierend auf diesen Ergebnissen die Variation der fluiden Phase.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Nitrocellulosebasierte *Dipstick* und *Lateral Flow* Schnelltests sind seit der Mitte des letzten Jahrhunderts in Bereichen wie der klinischen Diagnostik, Tiermedizin, Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Umweltüberwachung weit verbreitet. Besonders in infrastrukturell schwach entwickelten Regionen bieten sie eine gute Alternative zu aufwändigen Laboranalysen und erhöhen so die Gesundheit und Lebensqualität der Bewohner.^[4-5] Nitrocellulose als Substratmaterial für Schnelltests ist folglich eine gut erforschte und etablierte Option.

Dennoch rückt **Papier als alternatives Substratmaterial für *Lateral Flow Assays*** aktuell mehr und mehr in den Fokus der Forschung, denn es bietet viele Vorteile gegenüber Nitrocellulose. Es ist inhärent hydrophil, flexibel, wenig entzündlich sowie temperaturstabiler und günstiger als Nitrocellulose (Kapitel 1). Limitierungen wie beispielsweise die Grenzen der Sensitivität und Spezifität der mikrofluidischen, papierbasierten Schnelltests (μ PADs) verhindern aktuell allerdings noch eine ausreichende Konkurrenzfähigkeit des Substratmaterials Papier gegenüber der Nitrocellulose auf dem Markt. Diese Arbeit zeigte Ansätze auf, wie einige dieser Limitierungen durch vertiefende Forschung überwunden werden konnten. So könnten μ PADs zu einem wertvollen Instrument zur Verbesserung der Lebenssituation in Entwicklungsländern werden.

Um **aktuelle Limitierungen zu überwinden**, adressierte diese Arbeit folgende Leitfragen:

- Welche Papiersorten kommen als Substratmaterial in Frage? Welche Papiereigenschaften könnten besonders relevant für eine Retention von Analyten im Papier sein? Mit welchen Methoden können diese Eigenschaften charakterisiert werden?
- Welche Analyte sind als Modellmoleküle für erste Untersuchungen zur Retention in Papier geeignet? Welche Analyteigenschaften sind besonders relevant für eine Wechselwirkung mit Papier und wie können diese charakterisiert werden?
- Wie kann die Retention der Modellanalyte in Papier untersucht werden?
- Welche Parameter der soliden und fluiden Phase könnten einen Einfluss auf die Wechselwirkung von Analyt und Papier nehmen? Wie wirken sich diese Parameter auf die Wechselwirkung aus? Was kann aus diesen Beobachtungen für die zentralen Einflüsse und Mechanismen der Wechselwirkung der Analyte mit dem Substratmaterial geschlossen werden?
- Welche Erkenntnisse aus der Untersuchung der Wechselwirkung von Modellanalyten und Papier könnten gezielt eingesetzt werden, um deren Retention zu steuern? Wie könnten diese Erkenntnisse eingesetzt werden, um gezielt die Sensitivität und Spezifität im Modellsystem zu erhöhen?
- Inwieweit können die erlangten Erkenntnisse auf komplexe Analyte, wie Proteine, übertragen werden?

Untersucht wurden handgebildete Papiere aus Baumwolllintersfasern, da diese aufgrund des hohen Reinheitsgrades an Cellulose für die Anwendung in μ PADs als besonders geeignet erschienen. Des Weiteren wurden handgebildete Papiere aus Eukalyptussulfatfasern als Vergleichsmaterial für den Einsatz von Holzstoffen verwendet. Als Vergleichsmaterial für die in der Literatur häufig verwendeten kommerziell erhältlichen Filterpapiere mit Nassfestmittelanteil diente Roth 15A Filterpapier. Diese **drei Papiersorten** wurden vergleichend auf verschiedene möglicherweise für die Retention der Analyte relevante Parameter untersucht (Kapitel 4). Neben der chemischen

Zusammensetzung der Faserstoffe (Elementaranalyse in Abschnitt 4.1.1 und FTIR-Spektroskopie in Abschnitt 4.1.2) wurde auch die Faserbeschaffenheit (Abschnitt 4.2) sowie die **Ladungseigenschaften der Faserstoffe** (Abschnitt 4.3) und **zentrale Papiereigenschaften** (Abschnitt 4.4) untersucht. Für die weiteren Experimente besonders relevant waren die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen zur Untersuchung der Ladungseigenschaften der Faserstoffe sowie die Dicken- und Quecksilberporosimetriemessungen zur Charakterisierung der Dichte und Porengröße der Papiere. Bei Zetapotentialmessungen bei verschiedenen pH-Werten wurde festgestellt, dass Baumwollinters- und Eukalyptussulfatfasern einen ähnlichen charakteristischen Verlauf aufwiesen. Die Ladung der Faserstoffe war über den untersuchten pH-Bereich (pH 2–12) negativ und nahm nach einem Plateau zwischen pH 5–11 bei pH 12 noch einmal deutlich ab, was mit dem Deprotonierungsverhalten der Carboxyl- bzw. Hydroxylgruppen begründet wurde. Redispergierte Roth 15A Filterpapierfasern hingegen waren bis ca. pH 4 positiv geladen, was dem Vorhandensein von positiv geladenen Additiven im Papier zugeschrieben wurde. Die Messergebnisse des redispergierten Roth 15A Filterpapierfaserstoffs wiesen eine kontinuierliche Abnahme des Potentials über den gesamten Bereich auf, bis bei pH 12 ebenfalls ein deutlicher Sprung beobachtet werden konnte. Die Untersuchungen der Papierdichten zeigten einen annähernd exponentiellen Zusammenhang von Flächengewicht und Dichte (Abschnitt 4.4.1) des Substratmaterials. Die mittleren Porenradien der verwendeten Papiere lagen abhängig von der Papierdichte im Bereich von 2-8 μm (Abschnitt 4.4.2). Es wurde eine deutliche Abhängigkeit des Porenradiuses von der Papierdichte beobachtet. Die Papiersorte hatte hingegen kaum Einfluss auf den Porenradius.

Als Modellanalyte für erste Untersuchungen der Retention in Papier wurden der **negativ geladene Farbstoff Tartrazin** und der **positiv geladene Farbstoff Methylenblau** gewählt. Da es sich um Farbstoffe handelt, sind diese Analyte leicht kolorimetrisch zu detektieren. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungseigenschaften, die anhand von Ladungstitrations und UV-VIS-Messungen in Abhängigkeit des pH-Werts (Abschnitt 5.1) untersucht wurden, eignen sie sich hervorragend für eine Evaluation des Einflusses elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Retention von Analyten in Papier.

In Anlehnung an bekannte Verfahren wie Dünnschichtchromatographie oder Papierchromatographie (Abschnitt 3.2.1), wurde eine Vorgehensweise entwickelt mit der reproduzierbar der **Retentionsfaktor** der Analyte in Papier als hauptsächliche Vergleichsgröße zur Beurteilung der Retention bestimmt werden konnte (Abschnitt 3.3). Dabei wurde ein mikrostrukturiertes Papier mit einem beliebig gefüllten Fluidreservoir kontaktiert. Das Fluid durchströmte kapillarkraftgetrieben den mikrostrukturierten Kanal. Zu einem definierten Zeitpunkt wurde die Analytlösung mit einer Mikroliterpipette aufgetragen. Am Ende des Experiments wurde die vom Fluid zurückgelegte Strecke in Relation zu der vom Analyt zurückgelegten Strecke gesetzt und so der Retentionsfaktor berechnet.

Fluide und solide Phase können in diesem Aufbau leicht variiert werden. Daher wurde diese Methode im Anschluss genutzt, um die **Wechselwirkung der Modellanalyte mit dem Substratmaterial unter variierenden Parametern der fluiden und soliden Phase** zu untersuchen (Kapitel 5). Konkret wurde der Einfluss des pH-Werts (Abschnitt 5.2.1), der Leitfähigkeit (Abschnitt 5.2.2) und der Analytkonzentration der fluiden Phase (Abschnitt 5.2.3) auf die Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle mit dem Papiersubstrat betrachtet. Darüber hinaus wurde der Einfluss der soliden Phase in Bezug auf Papierdichte (Abschnitt 5.3.1) und Papiersorte (Abschnitt 5.3.2)

untersucht. Die Untersuchung der Farbstoffretention ergab deutliche Unterschiede in der Retention des positiv geladenen Methylenblaus und des überwiegend negativ geladenen Tartrazins im negativ geladenen mikrostrukturierten Substratmaterial Papier. Tartrazin wies bei einem hohen pH-Wert und einer geringen Leitfähigkeit die geringste Retention auf. Methylenblau hingegen wurde nahezu unabhängig von diesen Einflussparametern deutlich stärker reterniert (Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2). Bei beiden Farbstoffen führte eine erhöhte Analytkonzentration zu einem erhöhten Retentionsfaktor (Abschnitt 5.2.3). Dies wurde mit einer "Überladung" der in einem Kanalabschnitt vorhandenen Adsorptionsplätze aufgrund der hohen Anzahl an Analytmolekülen erklärt. Die Variation der Papierdichte beeinflusste nur in sehr begrenztem Maße die Retention beider Modellanalyte (Abschnitt 5.3.1). Die Papiersorte beeinflusste das Retentionsverhalten des negativ geladenen Tartrazins, nicht aber das des positiv geladenen Methylenblaus (Abschnitt 5.3.2). Diese Ergebnisse zusammengefasst ließen darauf schließen, dass das Modell der Adsorptionschromatographie für die Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle in Papier gut anzuwenden ist. Analyte in der mobilen Phase wechselwirken physikalisch mit Cellulosefasern. Komponentenspezifische Adsorptions- und Desorptionsprozesse führen zu unterschiedlich starker Retention. Eine zentrale Rolle müssen dabei elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem geladenen Substratmaterial und den geladenen Analytmolekülen spielen.

Diese Erkenntnis wurde genutzt, um die Retention der Analyte gezielt zu steuern und so die **Sensitivität und Spezifität von μ PADs im Modellsystem mit Farbstoffen zu optimieren**. Ein Farbstoffgemisch von positiv geladenen Methylenblaumolekülen und negativ geladenen Tartrazinmolekülen konnte durch einfache Wechselwirkung mit den negativ geladenen Cellulosefasern aufgetrennt werden. Durch die Einstellung einer möglichst geringen Leitfähigkeit der fluiden Phase wurde diese **Separation des Farbstoffgemischs** optimiert (Abschnitt 5.2.2). Die Auftrennung des Analytgemisches ermöglichte eine spezifische Analyse der Einzelkomponenten und erhöhte so die Spezifität des μ PADs.

Des Weiteren gelang es die **Sensitivität der Modell- μ PADs zu erhöhen**. Dazu wurde zunächst ein Polymer mit reaktiver *N*-Hydroxysuccinimidestergruppe mittels Photolithographie ortsspezifisch in definierten Bereichen des Kanals gebunden. In einem zweiten Schritt wurde dieses Polymer heterogen mit einem permanent positiv geladenen Amin umgesetzt, sodass positiv geladene Bereiche ("Patches") im Kanal entstanden (Abschnitt 6.1.2). An diesen Patches konnte der negativ geladene Modellfarbstoff Tartrazin gezielt reterniert werden. Die auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen eingebrachter positiver Ladung und negativer Ladung der Farbstoffmoleküle basierende Retention sorgte für eine lokale Konzentrationserhöhung der Moleküle, sodass auch Farbstoffe in vorher nicht detektierbaren Konzentrationen detektiert werden konnten (Abschnitt 6.3).

Schließlich sollten die Untersuchungsergebnisse auch für komplexere und daher anwendungsnähere Systeme als Farbstoffmoleküle verifiziert werden. Daher wurde das sehr stabile und durch eine Kooperation mit dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Schmitz besonders interessante **Protein IL-8 als Modellanalyt** für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. Zur Detektion wurde es mit TAMRA modifiziert. Zunächst wurde das Protein in Bezug auf seine Ladungseigenschaften in Abhängigkeit des pH-Werts modelliert (Abschnitt 7.1). Ein Umschlag der Oberflächenladung des Proteins von positiv auf negativ konnte zwischen pH 9 und pH 11 berechnet werden. Anschließend wurde der Einfluss des pH-Werts (Abschnitt 7.2.1) auf die Proteinretention in Papier untersucht. Die Änderung der Retention korrelierte direkt mit der Änderung der Oberflächenladung des

Proteins, was die Annahme einer hauptsächlich ladungsbasierten Wechselwirkung als Ergebnis der Farbstoffexperimente bestätigte. Weiterhin wurde auch hier der Einfluss der Analytkonzentration (Abschnitt 7.2.3) auf den Retentionsfaktor untersucht. Der Erklärungsansatz eines "Überladungseffekts" basierend auf einer begrenzten Anzahl an Adsorptionsplätzen wurde durch die Ergebnisse der Proteinretention unterstützt. Darüber hinaus konnte die unbekannte Konzentration einer Probelösung anhand des Retentionsfaktors mittels einer Kalibrationsgerade bis auf eine Zehnerpotenz genau bestimmt werden, was diesen Erklärungsansatz ebenfalls stützte. Es wurde kein Einfluss der Pufferart (Abschnitt 7.2.2) auf die Proteinretention detektiert, was für mögliche Anwendungen von μ PADs von Vorteil ist, da bei Analysen keine Rücksicht auf den verwendeten Puffer genommen werden muss. Organische Lösungsmittel als fluide Phase (Abschnitt 7.2.4) verringerten die Proteinretention in Papier durchschnittlich deutlich. Erklärungsansätze für diese Beobachtung könnten Denaturierung oder Konformationsänderungen des Proteins oder veränderte Wechselwirkungsmechanismen durch die Änderung der Polarität des Laufmittels sein. Die Erklärungsansätze müssten durch weitere Experimente, z.B. CD-spektroskopische Untersuchungen der Proteinstruktur in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, überprüft werden. Abschließend wurde untersucht, inwiefern die Modifikation des Substratmaterials mit dem proteinabweisenden Polymer Polydimethylacrylamid (Abschnitt 7.3.1) und *bovine serum albumin* (BSA) (Abschnitt 7.3.2) einen Einfluss auf die Proteinretention hat. Es wurde festgestellt, dass durch diese Modifikationen die Proteinretention leicht, wenn auch nicht signifikant, beeinflusst wurde.

Die vielfältigen und interessanten Erkenntnisse der Arbeit **bieten eine erste Plattform** für das komplexe Thema der Steuerung der Retention von zukünftig wohl vor allem anwendungsrelevanten Analyten, wie z.B. Proteinen in Papier. Zentraler Aspekt der weiteren Forschung sollte zunächst die Papieranalytik sein (Abschnitt 4.5). Zur besseren Charakterisierung der Ergebnisse ist eine Weiterentwicklung der verwendeten Techniken (Retentionsexperiment z.B. nach Di Risio *et al.*^[176] oder Lappalainen *et al.*^[81]) sowie ein Ausbau bekannter Analysetechniken (z.B. Festkörper-NMR) für Papier essentiell. Darüber hinaus wäre ein interessanter Ansatz, nach Möglichkeiten zu suchen, das zentrale Element der Wechselwirkungen, die Elektrostatik, z.B. durch Neutralisierung der faserinhärenten negativen Ladung zu umgehen. Dies könnte die Anwendungsmöglichkeiten von Papier als Substratmaterial für μ PADs stark erweitern. Besonders spannend wäre es die Retention von Proteinen steuern zu können. Vorstellbar wäre, basierend auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie, die ortsspezifische Immobilisierung von Liganden (z.B. Antigen) in Papier zur gezielten Bindung bestimmter Proteine.

9. Experimenteller Teil

9.1. Verwendete Reagenzien, Lösungsmittel und Materialien *

Reagenzien und Lösungsmittel

Acetonitril (ACN)	Honeywell, $\geq 99,9\%$
β -Alanin	Alfa Aesar, 98 %
Aluminiumoxid, basisch	Acros
(2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid (AEMAC)	Sigma-Aldrich, 99 %
2,2-Azobis(isobutyronitril) (AIBN)	Fluka, $\geq 98\%$
Chloroform	Fisher Scientific, ARG
Citronensäure	OC
Dichlormethan (DCM)	Roth, $\geq 99,9\%$
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	Alfa Aesar, 99 %
Diethylether (DEE)	Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$
<i>N,N</i> -Dimethylacrylamid	Sigma-Aldrich, 99 %
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF)	Roth, $\geq 99,8\%$
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, $\geq 99\%$
1,4-Dioxan	Roth, $\geq 99,9\%$
Essigsäure (ES)	OC
Ethanol (EtOH)	OC
Glycin	OC
4-Hydroxybenzophenon	Alfa Aesar, 98 %
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, $\geq 99,5\%$
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich, 98 %
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, $\geq 99\%$
Methacryloylchlorid	Alfa Aesar, 97 %
Methanol (MeOH)	OC
Methylenblau	AppliChem, $\geq 85\%$
Natriumchlorid	OC
Natriumdihydrogenphosphat	AC
Natriumhydroxid	Grüssing, 99 %
Natriumhydroxidlösung (1 M und 0,1 M)	Grüssing
Natriumtetraborat	AC
Ninhydrin	Sigma-Aldrich
1-Pyrenemethylmethacrylat (PyMA)	Sigma-Aldrich, 99 %
Rinderalbumin, Fraktion V (bovine serum albumin - BSA)	Roth, $\geq 98\%$
Salzsäure (1 M und 0,1 M)	Bernd Kraft GmbH
Styrol	Merck, $\geq 99\%$
Tartrazin	Sigma-Aldrich, $\geq 85\%$
Tetrahydrofuran (THF)	Roth, $\geq 99,5\%$
Triethylamin (TEA)	Roth, $\geq 99,5\%$

* ARG - analytical reagent grade; TUD - TU Darmstadt; PMV - Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik; OC - Chemikalienausgabe Organische Chemie; AC - Chemikalienausgabe Anorganische Chemie

Weitere Materialien:

Aminoethylrhodamin B	Synthese Schäfer <i>et al.</i> ^[161]
Baumwollinterszellstoff	PMV, TUD
Eukalyptussulfatzellstoff	PMV, TUD
Filterpapier Rotilab 15A	Roth
5(6)-Carboxytetramethylrhodamin-markiertes Interleukin 8	AK Schmitz, TUD

9.2. Verwendete Geräte und Software

Blattbildung

Baumwollinterszellstoff wurde mit dem Refiner LR40 von Frank-PTI, Deutschland in Kooperation mit dem Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik an der TU Darmstadt gemahlen. Der Eukalyptussulfatzellstoff wurde mit dem Aufschlaggerät AG 04 von Estanit, Deutschland aufgeschlagen.

Blätter aus Baumwollinters- und Eukalyptussulfatzellstoff wurden mit dem Rapid-Koethen 901772 Laborblattbildner der Firma Estanit, Deutschland hergestellt. Das Flächengewicht der gebildeten Blätter wurde direkt nach der vollständigen Trocknung gravimetrisch bestimmt.

UATR FTIR-Spektrometer

Die Aufnahme von Infrarot-Spektren erfolgte mit einem Spectrum One FTIR-Spektrometer von PerkinElmer, Deutschland. Das Spektrometer war ausgestattet mit einer Einfachreflexion-UATR-Einheit. Die Spektren wurden mit einer Anpresskraft von 30 oder 70 N aufgenommen. Jedes einzelne Spektrum setzte sich aus einer Überlagerung von zehn Einzelscans zusammen, die mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen wurden. Das Hintergrundrauschen führte zu einer Messabweichung der Transmission von bis zu 0,3 %.

Fluoreszenzmikroskop

Als Fluoreszenzmikroskop diente ein Olympus BX60 System-Mikroskop ausgestattet mit einer Quecksilberdampflampe. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit einer Olympus XM10 Kamera, die über die Software Olympus AnalySIS angesteuert wurde, durch verschiedene Anregungs- und Emissionsfilter.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die ^1H und ^{13}C -NMR Spektren wurden mit einem DRX 500 NMR Spektrometer (500 MHz) oder einem Avance III NMR Spektrometer (300 MHz) der Firma Bruker BioSpin GmbH (USA) an der TU Darmstadt aufgenommen.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopiemessungen wurden als Auftragsmessung im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Hess an der TU Darmstadt durch Herrn Kopp durchgeführt. Als Spektrometer wurde ein SSX 100 ESCA von Surface Science Laboratories Inc. (Singapur) verwendet. Die Anregung erfolgte mittels monochromatischer Al-K_α -Röntgenstrahlung einer Energie von 9 kV. Die Spektren wurden bearbeitet mit Hilfe der Software CASAXPS.

Elementaranalyse

Die Elementaranalysen zur Charakterisierung der Papierproben (Abschnitt 4.1.1) wurden als Auftragsmessung an der Goethe-Universität Frankfurt am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie von Frau Kalden durchgeführt. Es wurde ein varioMICROcube der Firma Elementar, Deutschland verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors. Als Trägergas diente Helium. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, die innerhalb der Fehlergrenzen von $\pm 0,3 \%$ lag. Die Nachweisgrenzen des Geräts lagen nach Herstellerangaben für Schwefel bei 10 ppb und für Stickstoff bei 15 ppb.

Die Elementaranalysen zur Untersuchung der fluoreszierenden Fluidfront (Abschnitt 9.8.2) wurden an der TU Darmstadt durchgeführt. Hier wurde ein VarioEL III CHN der Firma Elementar, Deutschland verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors. Als Trägergas diente Helium. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, die innerhalb der Fehlergrenzen von $\pm 0,1 \%$ lag. Der dynamische Arbeitsbereich des Geräts lag für Kohlenstoff zwischen 0,003–20 mg, für Stickstoff zwischen 0,003–2 mg und für Wasserstoff bei 0,003–3 mg.

Leitfähigkeit und pH-Wert

Die Leitfähigkeit diverser Proben wurde anhand des ino Lab Cond Level 2 Leitfähigkeitsmessgeräts von WTW ein Teil der weltweiten Xylem Analytics Inc. überprüft.

Der pH-Wert der Proben wurde mit Hilfe des pH-Meters pHenomel pH 1000L von VWR, Darmstadt eingestellt. Die Säure-Base-Titrationen erfolgten mittels des Titrierautomaten Titrand 905 von Metrohm, Schweiz.

UV-VIS

UV-VIS-Absorptionsspektren zwischen 320 nm und 800 nm wurden mit einem Cary 60 UV-VIS-Spektrometer von Agilent Technologie, USA aufgenommen. Eine Basislinienkorrektur bezogen auf das jeweils verwendete Lösungsmittel wurde durchgeführt. Die Lösungen wurden in PMMA-Küvetten bei Raumtemperatur gemessen.

Faseranalyse

Die Faseranalysen wurden mit dem Fiber Image Analyzer FS5 der Metso Group, Finnland in Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet für Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik an der TU Darmstadt durchgeführt.

Papierdickenmessung

In einer Auftragsmessung, durchgeführt von der Papiertechnischen Stiftung (PTS) in Heidenau durch Stefan Lupatsch unter Leitung von Dr. Marcel Haft, wurde die Papierdicke mit einem Pro Gage Dickenmesser (100mil) der Thwing-Albert Instrument Company, USA untersucht.

Ladungstitation

Das Strömungspotential verschiedener Proben wurde mithilfe des Partikelladungsdetektors Müttek PCD-03-pH der BTG Instruments GmbH (Schweiz) gemessen. Zur Titrationen wurden 665 Dosimaten von Metrohm, Schweiz verwendet.

Zetapotentialmessungen

Das Zetapotential der Zellstoffproben bei verschiedenen pH-Werten wurde mit einem Müttek SPZ-06 System der BTG Instruments GmbH, Schweiz in Zusammenarbeit mit der Fakultät für Verpackung und Papier der Hochschule München bestimmt.

Quecksilberporosimetrie

Die Quecksilberporosimetriemessungen wurden mit einem PoreMaster 60 GT System der Quantachrome GmbH, Deutschland in einer Auftragsmessung von der Papiertechnischen Stiftung (PTS) in Heidenau von Stefan Lupatsch unter Leitung von Dr. Marcel Haft durchgeführt.

Lithographie

Die UV-Belichtung erfolgte entweder mit einer Biolink BLX Belichtungskammer (Vilber Lourmat GmbH, Deutschland) bei $\lambda = 365$ nm oder einer 1000 W Oriel Belichtungsquelle (Newport, USA) ausgestattet mit einer Quecksilber/Xenon Lampe (1000W) und einem I-line Filter, der ausschließlich für Licht der Wellenlänge 365 nm durchlässig ist. Die Mikrostrukturierung erfolgte mittels bedruckter Polyestermasken (bvm maskshop, Obertshausen).

Auswertung der Retentionsexperimente

Die *Digitalisierung der Kanäle der Farbstoffretentionsexperimente* erfolgte mit Hilfe des Officescanners ECOSYS M6530cdn der Firma Kyocera (Kyoto, Japan). Die relevanten, eingestellten Scanparameter waren: TIFF-Datei, Auflösung 600x600 dpi, Autobelichtung "Aus", Kontrast- und Helligkeitseinstellungen "Normal".

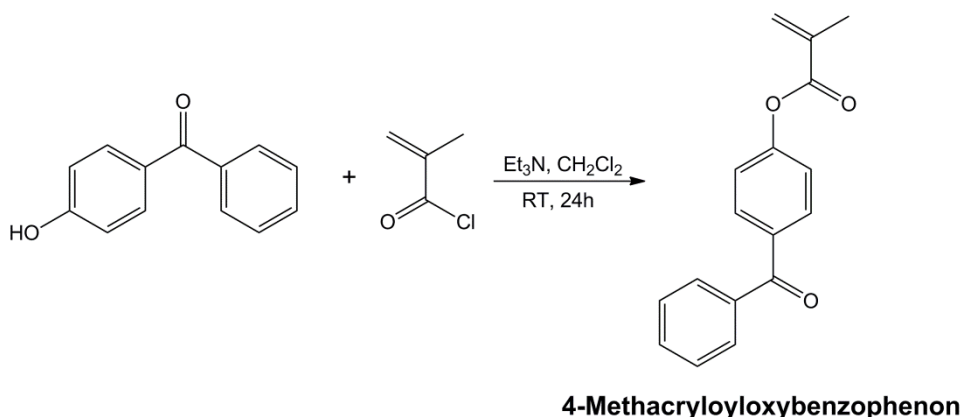
Die *Digitalisierung der Kanäle der Proteinretentionsexperimente* erfolgte mit Hilfe des UV-Transilluminators der Firma INTAS und des zugehörigen Kamerasystems, das mit der Software *INTAS GDS* bedient wird. Experimentell wurden die folgenden Parameter für optimale Aufnahmen bestimmt, die für alle Aufnahmen eingestellt wurden: Belichtungszeit 0,68 s, Verstärkung 1 %, digitalerstellte Grenzen zwischen 19 % und 75 %. Zu beachten war, dass die UV-Lampe vor der Aufnahme ca. eine Minute laufen sollte, um eine gleichbleibende Strahlung zu erzielen.

Um die Vergleichbarkeit verschiedener Aufnahmen beurteilen zu können, wurde immer ein Standard mit aufgenommen. Dieser bestand aus einem Streifen Papier aus Baumwollintersfasern mit einem Flächengewicht von 45 g m^{-1} , auf den jeweils $0,5 \mu\text{L}$ eine Lösung von IL-8-TAMRA in Puffer C verschiedener Konzentrationen nebeneinander aufgebracht wurden. Die verwendeten Konzentrationen waren: $7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Zur *Datenerhebung und Auswertung* wurde das Bildbearbeitungsprogramm *Image J2x 2.1.4.7 Image 1.0* von den Wayne Rasband National Institutes of Health, USA und die Software *OriginPro 8.6.0* der OriginLab Corporation, Northampton, USA verwendet. Zur Analyse der Proteinretentionsexperimente wurde des Weiteren das Programm *Grapher* von Apple herangezogen.

9.3. Monomer- und Polymersynthese

9.3.1. Synthese von 4-Methacryloyloxybenzophenon (MABP) nach Freidank^[25] & Berchtold^[177]



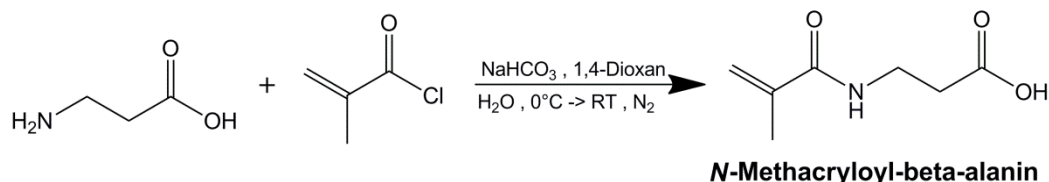
In einem 500 mL-Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Tropftrichter und Trockenrohr werden 20 g (100 mmol) 4-Hydroxybenzophenon vorgelegt. Anschließend werden 200 mL Dichlormethan (DCM) und unter Rühren 15,3 mL (110 mmol) Triethylamin zugegeben. Eine orangefarbene Lösung entsteht. Dann wird unter Rühren und Eiskühlung eine Lösung von 10,5 mL (110 mmol) entstabilisiertem Methacryloylchlorid in 40 mL DCM langsam zugetropft. Eine Triethylammoniumchloridfällung und eine leichte HCl-Gasentwicklung sind zu beobachten. Nach vollständiger Zugabe der Lösung wird weitere 15 min unter Eiskühlung und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das ausgefallene Triethylammoniumchlorid wird abfiltriert und mit 150 mL DCM gewaschen. Die organische Phase wird zunächst dreimal mit je 100 mL 0,1 M Salzsäure gewaschen und dann mit 100 mL VE-Wasser neutral gewaschen. Sie wird über Natriumsulfat getrocknet, nach Abfiltrieren des Trockenmittels unter Vakuum auf ca. 70 mL eingeeengt und in der fünffachen Menge kaltem Methanol ausgefällt. Da das Produkt nicht direkt ausfällt, wird die Lösung am Rotationsverdampfer etwas eingeeengt. Bei -20 °C über Nacht fällt das Produkt als weiße Kristalle aus, wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Für eine optimierte Ausbeute wird die Mutterlauge noch ein zweites Mal eingefroren und das Produkt abgesaugt und getrocknet. Beide Fraktionen liefern eine Ausbeute von 21,5 g (80 %; Literaturwert: 76 %^[25]). Eine Lagerung erfolgt im Eisfach. Eine Charakterisierung erfolgt mittels ¹H-NMR (Anhang).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 2,01 (dd, 3H, CH₃ (Alkyl)), 5,74 (dd, 1H, CH (Vinyl)), 6,32 (dd, 1H, CH (Vinyl)), 7,19 (m, 2H, CH (aromatisch) Überlagerung mit Lösungsmittelsignal), 7,42 (m, 2H, CH (aromatisch)), 7,52 (m, 1H, CH (aromatisch)), 7,73 (m, 2H, CH (aromatisch)), 7,81 (m, 2H, CH (aromatisch)).

9.3.2. Synthese von *N*-Methacryloyl- β -alaninsuccinimidester (MAC₂AE) nach Murata *et al.*^[178]

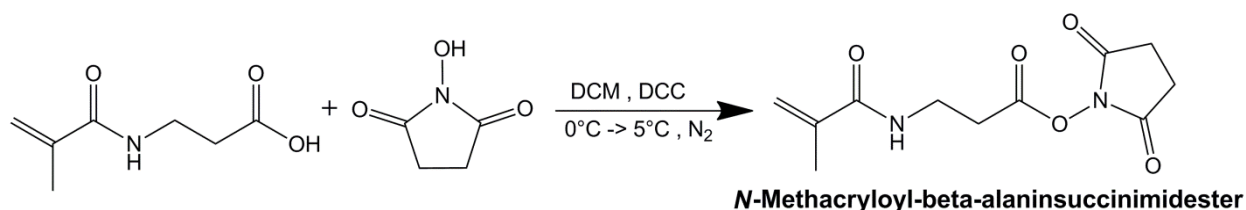
Die Synthese erfolgt zweistufig. Zunächst wird *N*-Methacryloyl- β -alanin synthetisiert.



In einem 500 mL-Dreihalskolben mit Stickstoffzuleitung und Tropftrichter werden 8,91 g (100 mmol) β -Alanin in 100 mL VE-Wasser gelöst. Anschließend werden 18,48 g (220 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 50 mL 1,4-Dioxan zugefügt. Zu der Suspension wird unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre eine Lösung von 102 mL (105 mmol) entstabilisiertem Methacryloylchlorid in 50 mL 1,4-Dioxan langsam zugetropft. Nach vollständiger Zugabe rührt die Lösung 15 Stunden unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur.

Nach Zugabe von 100 mL VE-Wasser wird die Reaktionslösung zweimal mit je 100 mL Essigester gewaschen. Die wässrige Phase wird anschließend unter Eiskühlung mit 5 M Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Daraufhin wird die Lösung fünfmal mit je 100 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration bei einer Badtemperatur von maximal 30 °C am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von ca. 20 mL eingengt. Nach Zugabe von ca. 25 mL *n*-Hexan beginnt das Produkt als weiße Flocken auszufallen. Nach 72 Stunden bei -20 °C wird das vollständig ausgefallene Produkt 7,26 g (46 %; Literaturwert: 70 %^[178]) abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Eine Lagerung erfolgt im Kühlschrank. Die Charakterisierung erfolgt mittels ¹H-NMR (Anhang). Es sind noch Reste von Lösungsmitteln zu detektieren.

¹H-NMR (MeOD, 300 MHz, δ in ppm): 1,93 (dd, 3H, CH₃ (Alkyl)), 2,55 (t, 2H, CH₂ (Alkyl)), 3,31 (Lösungsmittelsignal), 3,480 (t, 2H, CH₂ (Alkyl)), 3,66 (Lösungsmittelsignal), 4,89 (Lösungsmittelsignal), 5,37 (dd, CH (Vinyl)), 5,69 (dd, 1H, CH (Vinyl)).



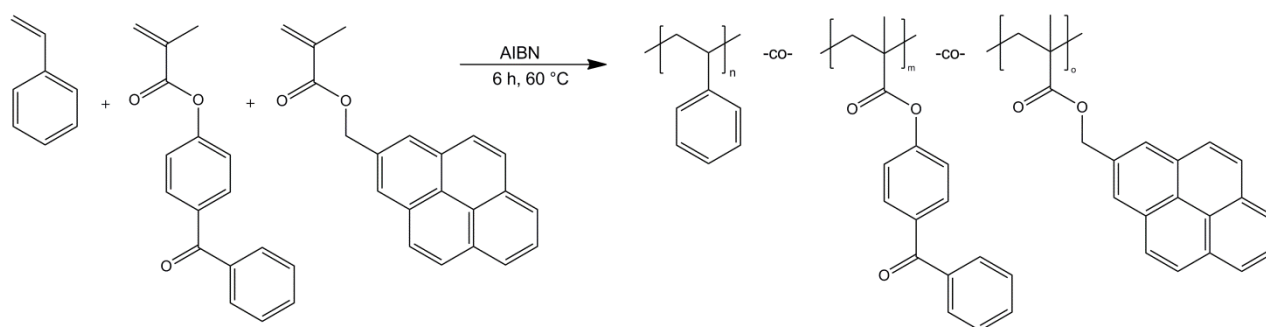
In einer zweiten Stufe erfolgt die Synthese des Zielprodukts MAC₂AE. Trotz Lösungsmittelresten im Zwischenprodukt wird dieses direkt eingesetzt. 4,0 g (25,45 mmol) *N*-Methacryloyl- β -alanin und 2,93 g (25,45 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in einem 100 mL-Kolben in 50 mL DCM dispergiert. Die Suspension wird im Eisbad und unter Stickstoffgegenstrom mit 5,25 g (25,45 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) versetzt. Die Mischung wird anschließend 2 Stunden bei 0 °C gerührt und dann unter Stickstoffatmosphäre über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird der ausgefallene Harnstoff abfiltriert und mehrfach mit DCM gewaschen. Die organische Phase wird unter Vakuum auf ca. 100 mL eingengt und über

Nacht bei -20 °C gelagert. Es fällt ein weißes Pulver aus, das abfiltriert und im Vakuum getrocknet wird. Aufgrund der geringen Ausbeute wird auch das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Beide Fraktionen enthalten unreines Produkt. Daher wird das Produkt in ca. 60 mL 2-Propanol bei 90 °C Ölbadtemperatur dispergiert und heiß filtriert. Der weiße Feststoff 4,65 g (72 %; Literaturwert: 78 %^[178]) wird abfiltriert und über Nacht im Vakuum getrocknet und anschließend im Kühlschrank gelagert. Eine Charakterisierung erfolgt mittels ¹H-NMR (Anhang). Es sind noch geringe Verunreinigungen von abreagiertem DCC und Propanol zu detektieren.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 1,96 (dd, 3H, CH₃ (Alkyl)), 2,86 (m, 6H, CH₂ (Alkyl)), 3,72 (m, 2H, CH₂ (Alkyl)), 5,35 (dd, 1H, CH (Vinyl)), 5,74 (dd, 1H, CH (Vinyl)), 6,56 (s (breit), 1H, NH (Amid)), 7,26 (Lösungsmittelsignal).

9.3.3. Synthese von P(S-*co*-MABP-*co*-PyMA) nach Böhm *et al.*^[23]

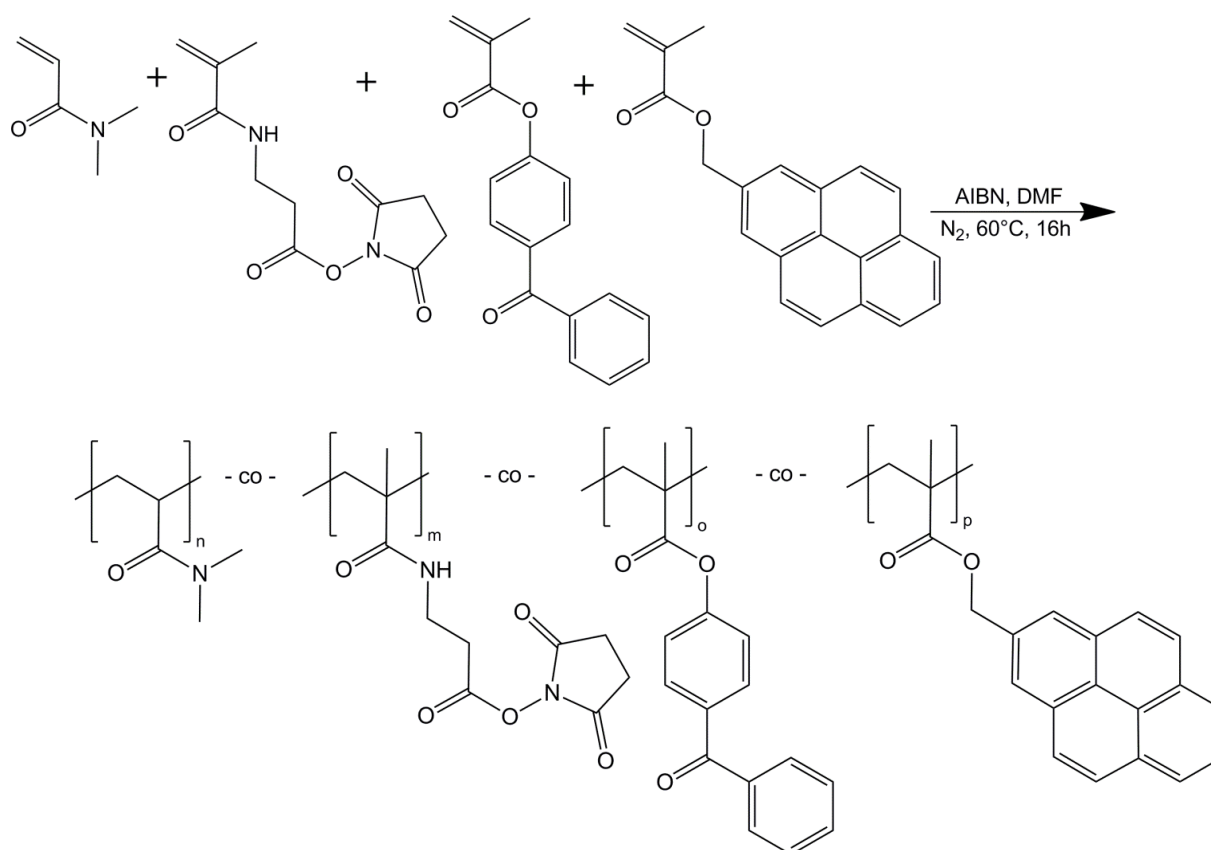


Die Synthese von P(S-*co*-MABP-*co*-PyMA) erfolgt als freie radikalische Substanzpolymerisation. 533 mg (2 mmol; 2,5 mol-%) MABP und 121 mg (0,4 mmol; 0,5 mol-%) 1-Pyrenemethylmethacrylat (PyMA) werden in einem Schlenkrohr vorgelegt. Im Stickstoffgegenstrom werden 7,87 g (76,04 mmol; 97 mol-%) entstabilisiertes Styrol und 38,7 mg (0,24 mmol) Azobis(isobutyronitril) (AIBN) zugegeben. Die entstehende blassgelbe Lösung wird dreimal mit Hilfe des *freeze-pump-thaw*-Verfahrens entgast. Bei 60 °C rührt die Lösung 6 Stunden. Dabei wird sie zunehmend viskoser. Nach 6 Stunden erfolgt ein Reaktionsabbruch durch die Zugabe von 30 mL THF unter Stickstoffgegenstrom und das Eintauchen der Lösung in ein Eisbad. Die Reaktionslösung wird über Nacht im Kühlschrank gelagert, bevor sie unter starkem Rühren durch langsames Zutropfen in ca. 600 mL Methanol (MeOH) gefällt wird. Das Polymer fällt als weißer, fluffiger Niederschlag aus, der abfiltriert und mit wenig MeOH gewaschen wird. Anschließend wird das Polymer im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute von 3,02 g (35 %; Literaturwert: 20 %^[23]) wird mittels ¹H-NMR (Anhang) und GPC analysiert. Die Einbauraten der einzelnen Monomere werden aus dem ¹H-NMR zu 6,6 mol-% für MABP und ca. 1 mol-% für PyMA abgeschätzt (Fehler durch Überlagerung der 2 Hs von MABP mit Styrolgruppe).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 0,08 (Schliff fett), 1,26–2,12 (CH₂ des Polymerrückgrats und CH₃ der MABP- und PyMA-Einheiten), 6,24–7,24 (5H des aromatischen Systems von Styrol überlagert mit 2Hs des aromatischen Systems von MABP), 7,26 (Lösungsmittelsignal), 7,41–7,86 (7H des aromatischen Systems von MABP) 7,94–8,24 (9H des aromatischen Systems von PyMA).

GPC (in THF, Polystyrol-Standards): M_n = 120.000 g mol⁻¹; Đ = 2,2.

9.3.4. Synthese von P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) nach Böhm^[24]



Die Synthese von P(DMAA-*co*-MAC₂AE-*co*-MABP-*co*-PyMA) erfolgt als freie radikalische Lösungspolymerisation. 3,47 g (3,5 mmol; 87,5 mol-%) entstabilisiertes *N,N*-Dimethylacrylamid (DMAA) werden im Stickstoffgegenstrom in einen Schlenkkolben zu einer Lösung von 1,02 g (4 mmol, 10 mol-%) MAC₂AE, 213 mg (0,8 mmol; 2,0 mol-%) MABP und 60 mg (0,2 mmol; 0,5 mol-%) PyMA in 40 mL Dimethylformamid (DMF) gegeben. Nach der Zugabe von 20 mg (0,12 mmol) AIBN als Initiator wird viermal mit Hilfe des *freeze-pump-thaw*-Verfahrens entgast. Anschließend wird die Reaktionslösung 16 Stunden bei 60 °C gerührt und bevor die Reaktion im Eisbad abgebrochen wird.

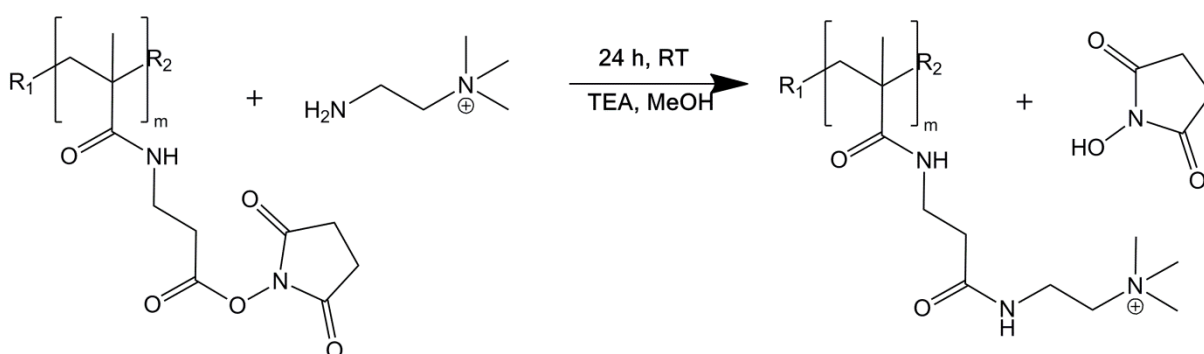
Die viskose, gelbliche Lösung wird anschließend in ca. 800 mL Diethylether (DEE) gefällt. Das Polymer fällt als weißer Feststoff aus und wird abzentrifugiert. Zur Aufreinigung wird es aus Chloroform in DEE umgefällt und unter Vakuum getrocknet. Die Lagerung des weißen Pulvers 3,88 g (80 %; Literaturwert: 59 %) erfolgt im Kühlschrank. Das Polymer wird mittels ¹H-NMR (Anhang), ¹³C-NMR (Abschnitt 6.1.1) und GPC untersucht. Die Einbauraten der einzelnen Monomere werden anhand entfalteter Integrale des ¹H-NMRs zu 15 mol-% MAC₂AE, 3,5 mol-% MABP und 1,0 mol-% PyMA ermittelt.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ in ppm): 0,78–1,86 (CH₂ des Polymerrückgrats und CH₃ der MAC₂AE-, MABP- und PyMA-Einheiten), 2,29–3,15 (CH₃ am tert. Amid der DMAA-Matrix, CH₂ benachbart zur Amidgruppe und im Succinimid in MAC₂AE), 3,27–3,72 (CH₂ benachbart zur Estergruppe in MAC₂AE), 7,26 (2H des aromatischen Systems von MABP überlagern mit Lösungsmittelsignal), 7,38–7,84 (7H des aromatischen Systems von MABP), 7,90–8,22 (9H des aromatischen Systems von PyMA).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ in ppm): 25,84 (CH_2 in Succinimid), 35,92 (CH_2 Polymerrückgrat/MAC₂AE zwischen Amid- und Esterfunktion, CH_3 Gruppen aller Monomere), 77,16 (Lösungsmittelsignal), 128,46–130,04 (Kohlenstoffe der aromatischen Systeme), 167,41–174,80 (Carbonylkohlenstoffe)

GPC (in $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ in Wasser mit $5 \text{ mL NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ bei pH 8, Polyacrylsäure-Standards): $M_n = 20.000 \text{ g mol}^{-1}$; $\bar{D} = 6,3$.

9.3.5. Polymeranaloge Umsetzung von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) in Lösung



* R_1/R_2 : Polymerrückgrat aus statistisch DMAA, MABP, PyMA und weiteren MAC₂AE

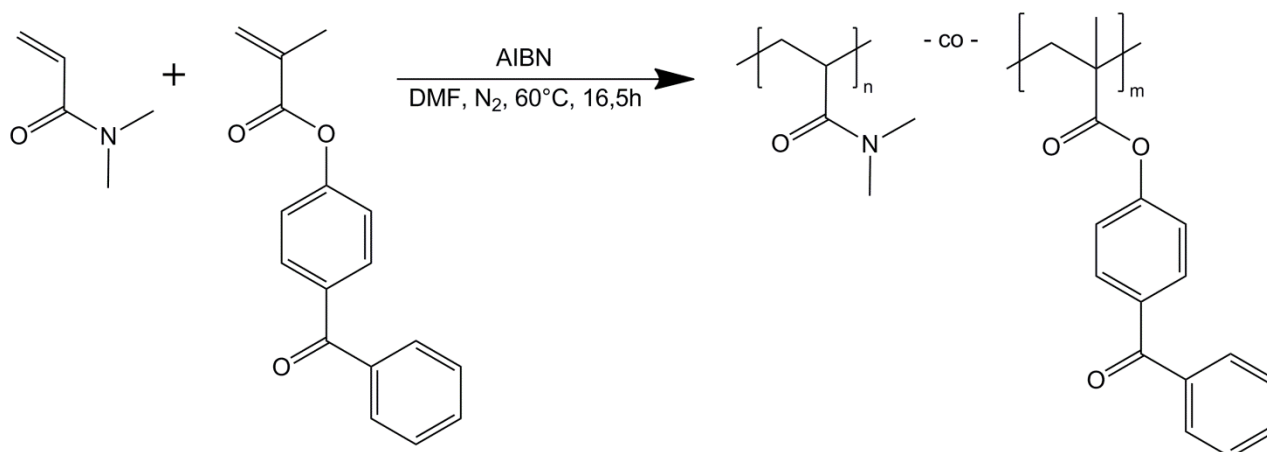
500 mg (0,047 mmol) P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) werden in einem 5-mL Schnappdeckelglas in 2 mL Methanol gelöst. 35 mg (0,2 mmol) (2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid (AEMAC) werden separat in 1,5 mL Methanol gelöst. Anschließend werden beide Lösungen vereinigt. Die resultierende blass-gelbe Lösung weist einen pH-Wert von 2,5 auf. Durch Zugabe von ca. 0,05 mL Triethylamin (TEA) wird der pH-Wert auf 7,4 erhöht und anschließend die Lösung im Dunkeln gerührt.

Nach 24 Stunden wird die Lösung in 100 mL Diethylether gefällt und abzentrifugiert. Das ausgefallene Polymer wird zweimal mit Diethylether gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Zur Abtrennung niedermolekularer Verbindungen wird das Produkt in ca. 15 mL Wasser gelöst und drei Tage dialysiert, bevor es durch Gefriertrocknung mit einer Ausbeute von 309 mg (62 %) als weißes Pulver zurückgewonnen wird.

Das Produkt P(DMAA-co-AEMAC-co-MABP-co-PyMA) wird direkt durch **FTIR-Analyse** untersucht und mit dem Spektrum des Edukts P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) bei einer Anpresskraft von 30 N verglichen (Abschnitt 6.1.1).

Zur Aufnahme wasserfreier **NMR-Spektren** des leicht hygroskopischen Produkts wird das Polymer zunächst mehrfach in D_2O gelöst und anschließend lyophilisiert. Anschließend werden ca. 50 mg in getrocknetem CDCl_3 gelöst und unter Argon gemessen. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 6.1.1 diskutiert.

9.3.6. Synthese von P(DMAA-co-MABP)



Die Synthese von P(DMAA-co-MABP) erfolgt als freie radikalische Lösungspolymerisation. In einem Schlenkkolben werden 213 mg (0,8 mmol; 2 mol-%) MABP vorgelegt. Unter Stickstoffgegenstrom werden 3,87 g (39,2 mmol; 98 mol-%) entstabilisiertes DMAA und 70 mL DMF zugegeben. Nach Zugabe des Initiators 13 mg (0,08 mmol) AIBN wird die Reaktionslösung viermal mittels des *freeze-pump-thaw*-Verfahrens entgast. Die Polymerisation erfolgt unter Rühren bei 60 °C in 16,5 Stunden. Nach Abbruch der Reaktion im Eisbad wird das DMF am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Der Rückstand wird in 30 mL reinstem Aceton gelöst und in ca. 500 mL DEE durch langsames Zutropfen gefällt. Das Produkt wird abzentrifugiert und unter Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das weiße, pulverförmige Polymer mit einer Ausbeute von 3,42 g (84 %) wird mittels ^1H -NMR (Anhang) und GPC untersucht. Die Einbaurate des MABP wurde anhand des ^1H -NMR zu 2,0 mol-% ermittelt.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 0,06 (Schliff fett), 0,75–1,93 (CH_2 des Polymerrückgrats und CH_3 der MABP-Einheit), 2,03 (Aceton), 2,24–3,19 (6H, CH_3 tert. Amid), 7,26 (2H des aromatischen Systems von MABP überlagern mit Lösungsmittelsignal), 7,40–7,99 (7H des aromatischen Systems von MABP).

GPC (in DMF + 3 g L^{-1} LiCl, Polymethylmethacrylat-Standards): $M_n = 15.000 \text{ g mol}^{-1}$; $\bar{D} = 3,1$.

9.4. Papierherstellung und Charakterisierung

9.4.1. Ausgangsmaterial

Baumwolllinters

Baumwolllintersfasern werden von der Papierfabrik Louisenthal GmbH, Deutschland bezogen und im Fachgebiet für Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik der TU Darmstadt gemahlen. Der Refiner wird mit der Garnitur 3/3-1.0-60 bei einer Energie von 200 kWh t^{-1} gefahren. Der Zellstoff wird mit einer Stoffdichte von 4 % 10 min in Leitungswasser aufgelöst. Die Umtriebszeit beträgt 5 min. Für eine schonende Mahlung wird eine spezifische Kantenbelastung (SEL) von $3,0 \text{ J m}^{-1}$ gewählt. Final wird so für den hauptsächlich verwendeten Faserbatch ein Schopper-Riegler-Wert von $24,5 \pm 0,7$ erreicht. Die so vorbereiteten Fasern werden anschließend mit einem Rapid-Koethen Blattbildner nach DIN 54358 ISO 5269/2 ohne Zusätze verarbeitet. Zu beachten ist, dass in Abwandlung der DIN-Norm eine Verteilung nicht kontinuierlich, sondern jeweils nur kurz vor der Zellstoffentnahme stattfindet, um zu verhindern, dass sich die langen Fasern ineinander verhaken.

Eukalyptussulfat

Eukalyptussulfatzellstoff wird von der Felix-Schöller Group, Deutschland bezogen. Nach einer Quellzeit von 24 Stunden wird der Zellstoff ungemahlen bei 150.000 Umdrehung aufgeschlagen. Die Blattbildung erfolgt nach DIN 54358 ISO 5269/2 ohne Zusätze.

Filterpapier Roth 15A

Das kommerziell erhältliche Filterpapier Roth 15A der Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland wird wie erworben eingesetzt. Es weist ein Flächengewicht von 84 g m^{-2} auf und besteht nach Herstellerangaben zu 100 % aus Baumwolllintersfasern. Die durchschnittliche Dicke gibt der Hersteller mit 0,14 mm an und den Aschegehalt mit 0,007 %. Es werden keine Binder allerdings PAE-Harz als Nassfestmittel eingesetzt. Die Filtereigenschaften werden als sehr langsam filtrierend beschrieben, was nach DIN 53137 in 180 s quantifiziert wird. Der Rückhaltebereich wird mit $2\text{-}3 \text{ }\mu\text{m}$ und die Bruchkraft mit $>0,2 \text{ kg cm}^{-2}$ angegeben (Hersteller).

9.4.2. Faserbeschaffenheit

Der Fiber Image Analyzer untersucht Fasern und Partikel verdünnter Zellstoffsuspensionen mittels Bildanalysetechnik. Die Kamera erfasst Graustufenbilder der Fasersuspension und bestimmt mittels Bildanalyse verschiedene Fasereigenschaften. Um möglichst genau den Zustand der Fasern im Papier widerzuspiegeln, wird die Zellstoffsuspensionen äquivalent zur Blattbildung vorbereitet. Folglich wird der gemahlene Baumwolllinterszellstoff, frisch aufgeschlagener Eukalyptussulfatzellstoff sowie redispergierte Blätter von Roth 15A Filterpapier stark verdünnt und untersucht. Es wird über die Ergebnisse von vier Einzelmessungen des Fiber Image Analyzers gemittelt. Die gemessenen Größen sind nach Bedienungsanleitung, wie in Tabelle 12 zusammengefasst, definiert.^[179]

Tabelle 12: Definitionen der mittels Faseranalyse ermittelten Größen.

Größe	Definition
Lc (I) (ISO)	nach Länge gewichtete mittlere Faserlänge, ISO 0,2–7,0 mm
Faserbreite	nach Länge gewichtete mittlere Faserbreite
Krümmung	nach Länge gewichtete mittlere Faserkrümmung in %
Feinstoffanteil A	Flockenartige Feinstoffpartikel als Prozentsatz der Projektionsfläche gemessener Partikel; Feinstofftyp A: Partikel unter 0,2 mm Länge
Fibrillierung	Verhältnis der Fibrillen der Projektionsfläche zur Projektionsfläche des gesamten Objekts in %

9.4.3. Zetapotentialmessungen

Eine geeignete Methode zur Bestimmung der Faserladung ist die Messung des Zetapotentials. Werden geladenen Partikel, wie Cellulosefasern oder Feinstoffe, in Wasser dispergiert, entsteht an der Grenzfläche zwischen Partikel und Flüssigkeit eine elektrostatische Ladung. Nach dem Modell der elektrischen Doppelschicht setzt sie sich aus zwei Schichten zusammen:

- 1) Stern-Schicht: stationäre Schicht von Gegenionen, die nicht abgescheert werden können.
- 2) Gouy-Chapman-Region: Diffuse in weiterem Abstand von der Partikeloberfläche gelagerte Schicht, deren Ionen durch Scherung bewegt werden können.

Das elektrische Potential über diese beiden Schichten nähert sich vom Maximum an der Partikeloberfläche immer stärker einem Nullwert im Bulk des Fluids an. Das Potential an der Grenzschicht zwischen Stern-Schicht und Gouy-Chapman-Region wird als Zetapotential ξ bezeichnet und kann als Maß für die Ladung der Cellulosefasern angesehen werden (Abbildung 103).^[180]

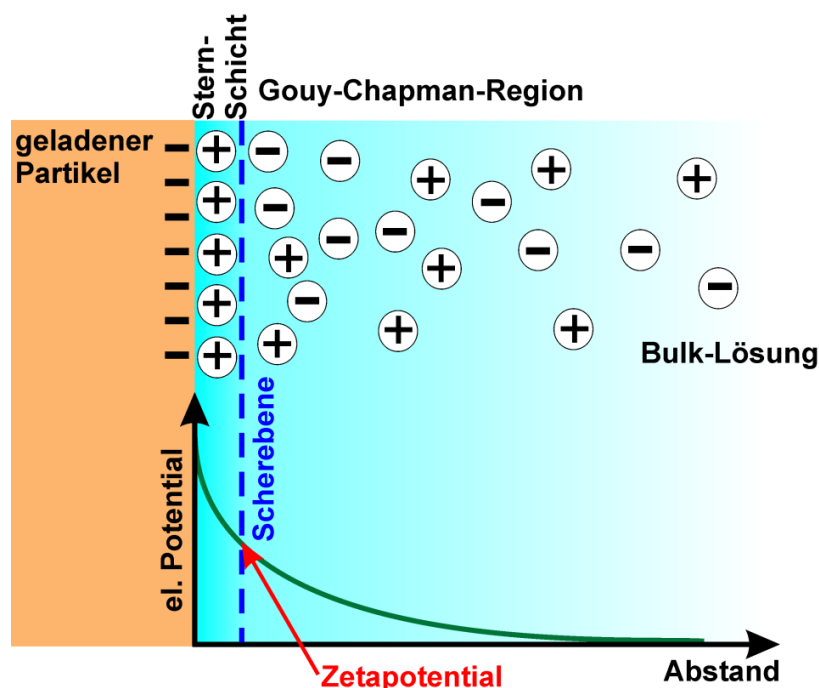


Abbildung 103: Schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht und des elektrischen Potentials als Abstandsfunction (nach Burke *et al.*^[180] und Goulet *et al.*^[181]).

Zellstoffsuspensionen von Eukalyptussulfat, gemahlenen Baumwolllinters und redispergiertem Roth 15A Filterpapier mit einer Stoffdichte von 0,7 wt-% in Leitungswasser werden unter Rühren mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf die in Tabelle 13 bis Tabelle 15 angegebenen pH-Werte eingestellt. Wie von Garcia *et al.*^[75] publiziert, ist das Zetapotential von Zellstoffsuspensionen u.a. abhängig von der elektrischen Leitfähigkeit der Probe. Da die Leitfähigkeit der Proben durch die Einstellung verschiedener pH-Werte variiert, wird nach der Einstellung des pH-Werts auch die Leitfähigkeit durch Zugabe von Natriumchlorid für alle Proben auf einheitliche 6,4 mS cm⁻¹ für die Eukalyptussulfatzellstoffsuspensionen und 6,6 mS cm⁻¹ für die Baumwolllinterszellstoffsuspensionen und die redispergierte Roth 15A Filterpapierzellstoffsuspensionen eingestellt. Generell kann das Zetapotential anhand von Elektrophorese oder Strömungspotentialmessungen ermittelt werden. In dieser Arbeit wird es anhand von Strömungspotentialmessungen der vorbereiteten Zellstoffsuspensionen in einer Dreifachmessung bestimmt. Dabei werden Fasern und Feinstoffe der Suspension durch ein feinmaschiges Sieb zurückgehalten, während das Fluid an diesem Faserpfropf vorbeigedrückt wird. So scheren die beweglichen Ionen der Gouy-Chapman-Region ab und werden mit dem Fluid transportiert. Es entsteht vor und nach dem Zellstoffpfropf eine Potentialdifferenz, das Strömungspotential, das durch zwei Elektroden gemessen und vom Messgerät automatisch nach Gleichung 26 (Herstellerinformation) in das Zetapotential umgerechnet wird.

$$\zeta = \frac{3 \cdot (\chi + 1) \cdot U}{\Delta p} \quad (26)$$

mit ζ Zetapotential in mV
 χ elektrische Leitfähigkeit in mS cm⁻¹
 U Strömungspotential in mV
 Δp Druckdifferenz in bar

Die resultierenden Werte sind in Tabelle 13 bis Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 13: Eingestellte pH-Werte und gemessene Zetapotentiale der Eukalyptussulfatzellstoffsuspensionen.

pH	Δ pH	ζ [mV]	$\Delta\zeta$ [mV]
2,17	0,18	-2,5	0,7
3,14	0,12	-8,0	0,7
4,07	0,09	-12,2	1,2
4,54	0,41	-13,2	1,2
5,42	0,50	-15,3	1,5
6,93	0,27	-17,2	1,5
7,61	0,49	-17,2	1,6
8,07	0,83	-19,2	1,6
10,39	0,33	-18,5	1,5
11,34	0,30	-19,5	1,3
12,23	0,20	-27,0	1,9

Tabelle 14: Eingestellte pH-Werte und gemessene Zetapotentiale der Baumwollinterszellstoffsuspensionen.

pH	ΔpH	ζ [mV]	$\Delta\zeta$ [mV]
2,15	0,17	-2,4	0,4
3,15	0,11	-6,9	0,6
5,43	1,23	-11,4	0,8
5,95	0,84	-15,0	1,1
6,59	0,55	-15,2	1,0
7,47	0,42	-12,7	0,8
7,97	0,07	-14,3	0,9
8,43	0,48	-16,1	1,3
9,99	0,08	-11,9	0,6
10,94	0,11	-11,7	0,5
12,17	0,14	-21,7	0,9

Tabelle 15: Eingestellte pH-Werte und gemessene Zetapotentiale der Roth 15A Filterpapierzellstoffsuspensionen.

pH	ΔpH	ζ [mV]	$\Delta\zeta$ [mV]
2,18	0,17	4,8	0,3
3,17	0,15	1,9	0,1
4,52	0,44	-0,3	0,3
6,11	0,98	-1,9	0,2
6,60	0,51	-3,2	0,2
7,28	0,35	-3,9	0,4
7,75	0,42	-4,8	0,4
8,98	0,09	-8,9	0,6
10,17	0,17	-9,5	0,6
11,36	0,32	-13,8	0,7
12,21	0,18	-24,6	1,1

9.4.4. Papierdichte

Zunächst wird die Papierdicke s von jeweils zwei Blättern aller Flächengewichte bestimmt. Anschließend wird die Papierdichte ρ berechnet (Gleichung 2). Zur Bestimmung des Flächengewichts A wird das direkt nach der Blattbildung bestimmte *otro*-Gewicht der Blätter (Abschnitt 9.4.1) verwendet. Die Standardabweichung der Doppelbestimmung wird als Fehler eingesetzt.

Tabelle 16: Papierdicken und -dichten der verwendeten Papiersorten für alle untersuchten Flächengewichte.

Probe	Blatt 1			Blatt 2			Mittelwert	
	A	s	ρ	A	s	ρ	ρ_m	$\Delta \rho$
	[g m ⁻²]	[μ m]	[kg m ⁻³]	[g m ⁻²]	[μ m]	[kg m ⁻³]	[kg m ⁻³]	[kg m ⁻³]
Linters 27	27,1	61,5	439,8	26,4	59,8	441,8	440,8	1,4
Linters 45	45,2	84,1	537,5	44,6	84,0	530,5	534,0	4,9
Linters 76	75,1	137,6	545,9	76,1	138,3	550,0	548,0	2,9
Linters 84	82,8	146,4	565,3	82,8	154,0	537,4	551,4	19,7
Linters 160	158,8	277,4	572,5	159,8	272,7	586,0	579,2	9,5
Eukalyptus 27	24,7	50,1	493,8	26,7	52,2	512,3	503,0	13,0
Eukalyptus 45	45,8	88,4	518,1	45,5	88,5	514,4	516,2	2,7
Eukalyptus 76	75,1	133,0	564,8	76,4	136,8	558,5	561,6	4,5
Eukalyptus 84	84,6	152,4	555,1	85,0	151,7	560,2	557,7	3,6
Eukalyptus 160	160,8	282,7	568,6	162,0	281,0	576,6	572,6	5,6
Roth 15A	89,1	147,6	603,4	89,1	149,8	594,9	599,2	6,0

9.4.5. Quecksilberporosimetrie

Die Quecksilberporosimetrie ist eine geeignete Methode zur Ermittlung der Porengrößenverteilung, des spezifischen Porenvolumens sowie der Porosität einer Probe mit Poren im Bereich von 500 μ m bis 3,5 nm. Daher wird sie häufig für die Analyse von Papierproben eingesetzt. Quecksilber als nicht benetzende Flüssigkeit dringt nur unter Druck in Kapillarräum ein. Dabei ist die Stärke des benötigten Drucks über die Washburn-Beziehung mit der entsprechenden Porengröße verknüpft. Durch Messung des Volumens an intrudiertem Quecksilber bei einem bekannten Druck kann unter der Annahme, dass alle Poren zylindrisch aufgebaut sind, über die Washburn-Beziehung die Porengrößenverteilung einer Probe und daraus auch die Porosität bestimmt werden.^[182]

Quecksilberporosimetriemessungen der verwendeten Papiersorten aller verwendeten Flächengewichte werden zur Bestimmung der Porosität, des mittleren Porenradiuses sowie des Gesamtporenvolumens durchgeführt (Tabelle 17). Die Messungen erfolgen in einer Doppelbestimmung, deren Standardabweichung als Fehler eingesetzt wird (Prüfbericht im Anhang).

Tabelle 17: Ergebnisse der Quecksilberporosimetriemessung: mittlerer Porendurchmesser r , Porenvolumen V und Porosität P für Papiere verschiedener Flächengewichte aus Baumwolllinters-, Eukalyptussulfatzellstoff sowie kommerziell erhältlichem Filterpapier Roth 15A. Alle Ergebnisse für einen Porenbereich von $d = 0\text{--}35 \mu\text{m}$.

Probe	r [μ m]	$\Delta\sigma(r)$ [μ m]	V [mL g ⁻¹]	$\Delta(V)$ [mL g ⁻¹]	P [%]	$\Delta(P)$ [%]
Linters 27 g m ⁻²	7,29	0,00	0,69	0,01	30,4	0,5
Linters 45 g m ⁻²	5,15	0,10	0,58	0,01	30,8	0,7
Linters 76 g m ⁻²	4,83	0,02	0,69	0,04	37,5	1,8
Linters 84 g m ⁻²	4,77	0,30	0,49	0,04	27,8	2,1
Linters 160 g m ⁻²	3,30	0,00	0,57	0,02	32,3	1,1
Eukalyptus 27 g m ⁻²	5,89	0,06	0,83	0,14	41,0	7,0
Eukalyptus 45 g m ⁻²	5,32	0,04	0,86	0,13	44,6	6,9
Eukalyptus 76 g m ⁻²	4,40	0,08	0,84	0,08	47,1	4,3
Eukalyptus 84 g m ⁻²	4,44	0,03	0,88	0,05	48,5	3,0
Eukalyptus 160 g m ⁻²	3,78	0,16	0,81	0,00	46,0	0,1
Roth 15A Filterpapier	2,69	0,13	0,48	0,06	28,9	3,4

Abbildung 104 zeigt die Auftragung der Porendichte gegen das Porenvolumen. Da das Porenvolumen direkt in die Berechnung der Porosität eingeht (Gleichung 3) und diese in Abschnitt 4.4 ausführlich diskutiert ist, wird auf das Porenvolumen hier nicht weiter eingegangen.

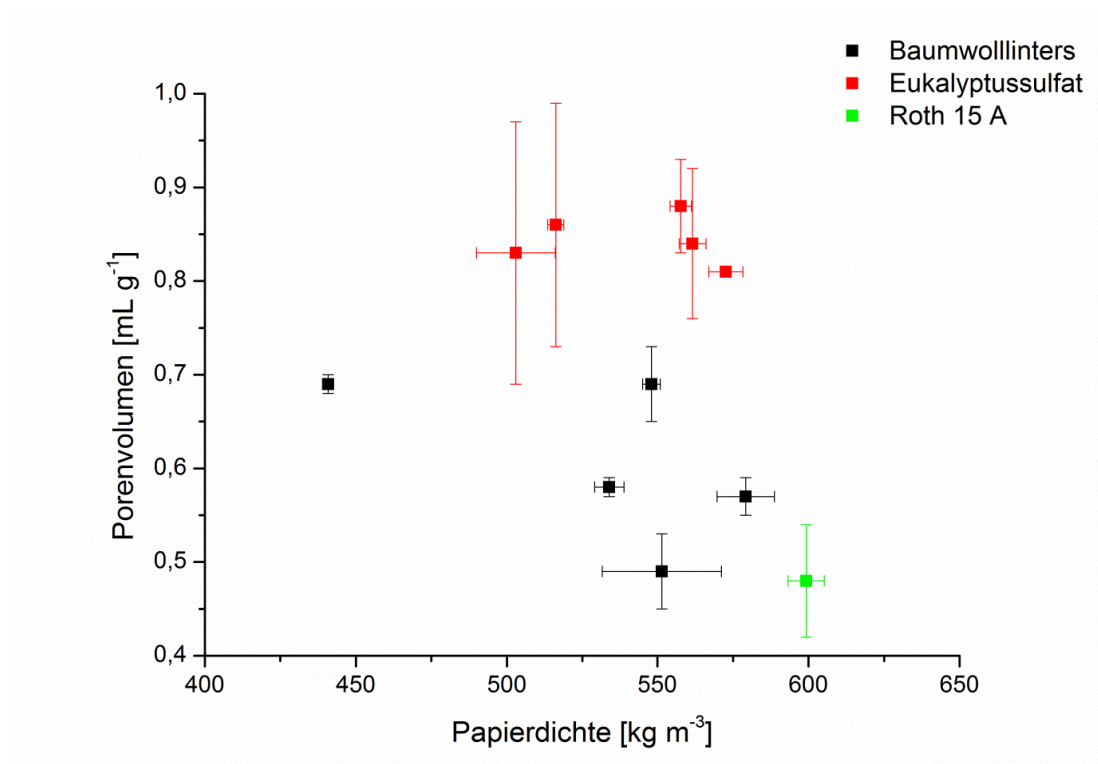


Abbildung 104: Porenvolumen bestimmt mittels Quecksilberporosimetrie als Funktion der Papierdichte für verschiedene Papiere aus Baumwollinters-, Eukalyptussulfatzellstoff sowie kommerziell erhältlichem Filterpapier Roth 15A. Alle Ergebnisse für einen Porenbereich von $d = 0\text{--}35\ \mu\text{m}$.

9.5. Mikrostrukturierung von Papiersubstraten

9.5.1. Herstellung von mikrostrukturierten Papiersubstraten

Die Mikrostrukturierung der Papiersubstrate für vertikale Systeme erfolgt mittels "Cuttings" (Abschnitt 1.1). Die Probenvorbereitung ist in Abschnitt 3.3.2 bereits ausreichend beschrieben. Die Mikrostrukturierung der Papiersubstrate für horizontale Systeme erfolgt mittels der von Böhm *et al.* ^[21, 23] publizierten Methode der Lithographie von photoreaktiven Polymeren (Abschnitt 1.1). Diese Methode soll im Folgenden im Detail dargestellt werden.

Das hydrophobe Polymer P(S-co-MABP-co-PyMA) wird mit einer Konzentration von $30\ \text{mg mL}^{-1}$ in THF gelöst. Die Papiersubstrate werden mit Hilfe einer Papierschneidemaschine in $2,5 \times 5,5\ \text{cm}$ große Rechtecke geschnitten. Diese Papiersubstrate werden für jeweils ca. 20 s vollständig in die Polymerlösung getaucht, anschließend herausgezogen und auf einer Glasoberfläche flach für 30 min zum Trocknen ausgelegt. Diese Vorgehensweise ist allgemein unter dem Begriff Tauchbeschichtung bekannt. Das photoreaktive Polymer ist nun physisorbiert auf dem gesamten Papiersubstrat gebunden. Durch selektive Bestrahlung des beschichteten Papiersubstrats durch eine Photomaske, die einen rechteckigen Bereich von $0,4 \times 5,0\ \text{cm}$ abdeckt, wird das Polymer an die bestrahlten Bereiche kovalent gebunden. Die UV-Bestrahlung erfolgt bei einer Wellenlänge von 365 nm mit einer definierten Energiedosis von $16\ \text{J cm}^{-2}$. Beim Aufbringen der Photomaske ist darauf zu achten, dass sie eng am Papiersubstrat anliegt, um die nicht zu bestrahlenden Bereiche

ausreichend abzudecken. Um dies zu gewährleisten wird die Maske mit UV-Licht durchlässigem Tesafilm fixiert. Die schwarzen Bereiche der Photomaske absorbieren das UV-Licht, sodass das Polymer unter diesen Bereichen weiterhin ausschließlich physisorbiert vorliegt. So ist es möglich, dass die Polymere nach der Belichtung in diesen Bereichen in einer 2,5-stündigen Soxhlet-Extraktion mit THF wieder entfernt werden können. Gleichzeitig bleiben die Polymere in den bestrahlten Bereichen kovalent an das Papiersubstrat gebunden und können als Barrieren für wasserbasierte Fluide fungieren. Alle vorbereiteten Papiersubstrate werden für mindestens 15 h unter Normklimabedingungen ($T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 % relative Luftfeuchtigkeit) gelagert, bevor sie für Experimente verwendet werden.

9.5.2. Implementierung von "Patches" in mikrostrukturierten Papiersubstraten

Für einige Experimente erfolgt die Mikrostrukturierung der Papiersubstrate in zwei Schritten. In die mittels hydrophobem Polymer erzeugten Kanäle werden in einem zweiten Schritt zusätzlich funktionale "Patches" eingebracht. Auch in diesem Schritt basiert die Strukturierung auf der Lithographie photoreaktiver Polymere und erfolgt wie in Abschnitt 9.5.1 beschrieben.

Anstelle des hydrophoben Polymers soll jedoch das reaktive P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) ortsspezifisch eingebracht werden. Dazu wird eine Polymerlösung einer Konzentration von 30 mg mL^{-1} in Chloroform hergestellt. Als Substrat dient ein bereits mit Kanal strukturierter Papierstreifen. Dieser physisorbiert das Polymer zunächst gleichmäßig mittels Tauchbeschichtung. Während der anschließenden Bestrahlung bedeckt eine Photomaske das gesamte Substrat außer dem ein bzw. zwei Zentimeter langen und 0,4 cm breiten Patch im mittleren Bereich des Kanals (Abbildung 105). So findet ausschließlich in diesem Bereich eine kovalente Anbindung des funktionalen Polymers statt. Sobald das rein physisorbierte Polymer nach 3 h Extraktion mit Chloroform von allen anderen Bereichen herunter extrahiert wurde, bildet dieser Bereich den funktionalen Patch.

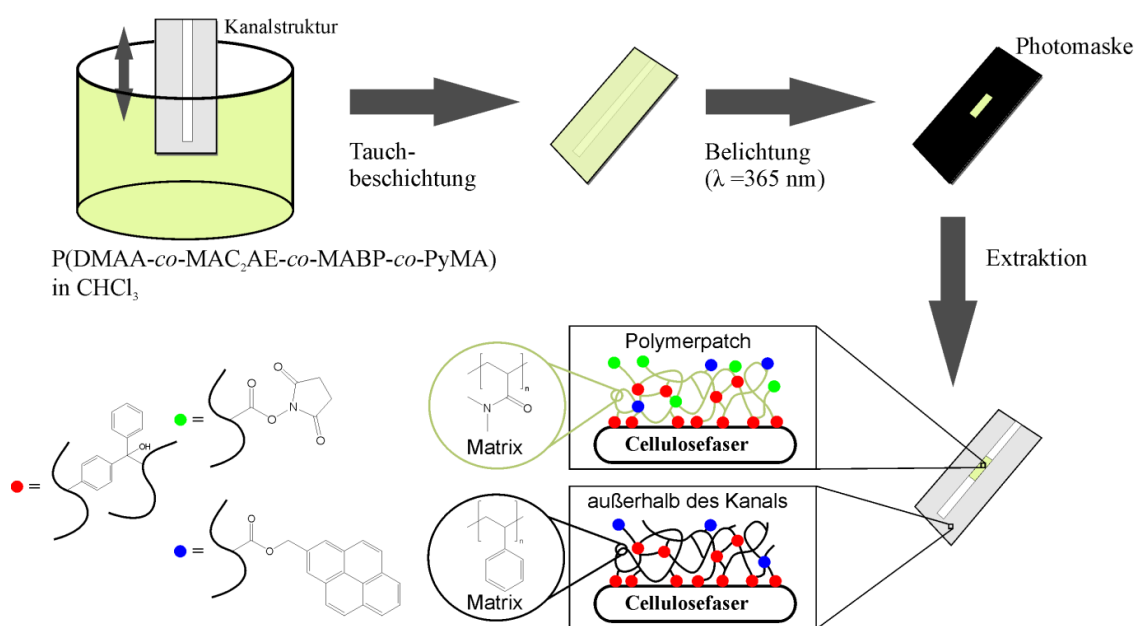


Abbildung 105: Schematische Darstellung der Implementierung von Patches in vorstrukturierte Papiersubstrate mittels Photolithographie mit photoreaktiven Polymeren. Das tauchbeschichtete Polymer wird durch Bestrahlung kovalent im nicht durch die Photomaske abgedeckten Bereichen gebunden. Nach Extraktion des ausschließlich physisorbierten Polymers bietet der hydrophile Patch reaktive Succinimidgruppen zur Anbindung beliebiger Funktionen.^[132]

Für einige Experimente sollen auch Patches aus P(DMAA-co-AEMAC-co-MABP-co-PyMA) (Abschnitt 6.2) implementiert werden. Hier entspricht die Vorgehensweise exakt der beschriebenen Methode zum Implementieren von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patches.

9.5.3. Modifikation von Patches

P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patches bieten generell die Möglichkeit verschiedene Funktionalitäten durch eine heterogene polymeranaloge Umsetzung an MAC₂AE zu binden. In dieser Arbeit soll durch (2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid (AEMAC) eine positive Ladung eingebracht werden. Dieses Molekül besitzt zwei funktionelle Gruppen. Einerseits eine permanente positive Ladung in Form eines quartären Amins, andererseits eine primäre Amingruppe, die präferiert mit der Succinimidfunktionalität in MAC₂AE reagiert (Abschnitt 6.1.1). Dazu wird zunächst eine methanolische Lösung von AEMAC mit einer Konzentration von 0,2 mmol mL⁻¹ angesetzt, deren pH-Wert durch Zugabe von Triethylamin auf 7,4 eingestellt ist. Die mikrostrukturierten Papiere mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patches werden in dieser Lösung für 24 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt (160 rpm). Danach werden sie für 20 min im Vakuum getrocknet und anschließend für mindestens 2 h mit Methanol extrahiert. Die mikrostrukturierten Papiersubstrate werden für mindestens 15 h unter Normklimabedingungen (T = 23 °C, 50 % relative Luftfeuchtigkeit) gelagert, bevor sie für Experimente verwendet werden. Die Datenerhebung erfolgt dabei weiterhin äquivalent zu der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise.

9.6. Retentionsexperimente der Farbstoffe

Der Versuchsaufbau, die Durchführung sowie die Datenerhebung und die Auswertung der Retentionsexperimente der Farbstoffe ist in Abschnitt 3.3.1 detailliert beschrieben. Anhand dieser Vorgehensweise wird der Einfluss auf das Retentionsverhalten der Farbstoffe Tartrazin und Methylenblau in Abhängigkeit verschiedener Parameter der fluiden Phase und des Substrats untersucht. Konkret werden der Einfluss des pH-Werts, der Leitfähigkeit sowie der Farbstoffkonzentration für die fluide Phase analysiert und der Einfluss der Papierdichte und des Papiertyps für das Substrat. Zunächst werden die Farbstoffe eingehend untersucht.

9.6.1. Chemische Struktur der Farbstoffe in Abhängigkeit des pH-Werts

Säure-Base-Titration

Eine Tartrazinlösung von 20 mg mL⁻¹ in einer Eukalyptussulfatzellstoffsuspension (1 wt-%) sowie eine Methylenblaulösung von 1 mg mL⁻¹ in einer Eukalyptussulfatzellstoffsuspension (1 wt-%) werden unter Rühren (1000 rpm) in 10 µL Schritten automatisch (monoton) titriert. Der pH-Wert der Lösungen wird in einem zweistufigen Titrationsprogramm zunächst mit 1 M Salzsäure auf pH 1,5 eingestellt und anschließend durch Titration mit 1 M Natronlauge kontinuierlich auf 12,3 erhöht. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

UV-VIS-Spektren

Tartrazinlösungen (0,0187 mmol L⁻¹) und Methylenblaulösungen (0,01 mmol L⁻¹) in deionisiertem Wasser werden mit Salzsäure und Natronlauge auf pH 1–13 eingestellt. Im Detail werden 1,5 mL Tartrazinlösung (c = 0,187 mmol L⁻¹) bzw. 5 mL Methylenblaulösung (c = 0,1 mmol L⁻¹) mit ca.

7 mL VE-H₂O verdünnt und anschließend mit HCl bzw. NaOH auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Dann wird die Probe auf 15 mL aufgefüllt ($c = 0,0187 \text{ mmol L}^{-1}$ bzw. $c = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) und der pH-Wert noch einmal geprüft. Die UV-VIS-Spektren werden schließlich in PMMA-Küvetten mit VE-H₂O als Blank aufgenommen.

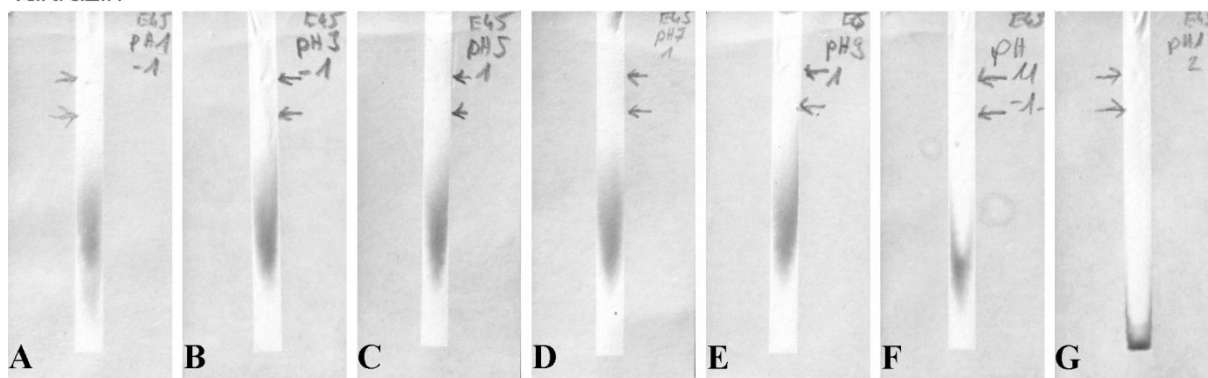
9.6.2. Einfluss des pH-Werts

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Eukalyptussulfatpapier des Flächengewichts 45 g m^{-2} (SW129) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Fluid wird deionisiertes Wasser verwendet, das mit Salzsäure und Natronlauge auf pH 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13 eingestellt wird. Anschließend wird mit Hilfe von Natriumchlorid die Leitfähigkeit aller Proben einheitlich auf 25 mS cm^{-1} eingestellt. Ebenso wird mit einer Tartrazinlösung der Konzentration 4 mmol L^{-1} und einer Methylenblaulösung der Konzentration $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ (hier nur pH 1–9) verfahren. Diese Farbstofflösungen dienen als Analytlösungen. Für jeden pH-Wert wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten Laufzeiten sind in Tabelle 18 unter \bar{x} (Laufzeit) zusammengefasst. $\sigma(\bar{x})$ bezeichnet die zugehörige Standardabweichung nach Gleichung 12. \bar{x}_{ges} (Laufzeit) und $\sigma_{\text{ges}}(\bar{x})$ bezeichnen den Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung aus den Mittelwerten der Laufzeiten aller pH-Werte. Abbildung 106 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe jedes Farbstoffes für jeden pH-Wert.

Tabelle 18: Gemittelte Laufzeiten und zugehörige Standardabweichungen der Retentionsexperimente in Abhängigkeit des pH-Werts für Tartrazin und Methylenblau.

	Tartrazin		Methylenblau	
pH	\bar{x} (Laufzeit) [s]	$\sigma(\bar{x})$ [s]	\bar{x} (Laufzeit) [s]	$\sigma(\bar{x})$ [s]
1	148	6	141	24
3	140	17	137	19
5	144	12	149	29
7	117	3	125	7
9	145	19	127	29
11	138	14		
13	128	11		
\bar{x}_{ges} (Laufzeit) [s]	137		136	
$\sigma_{\text{ges}}(\bar{x})$ [s]	11		10	

Tartrazin



Methylenblau

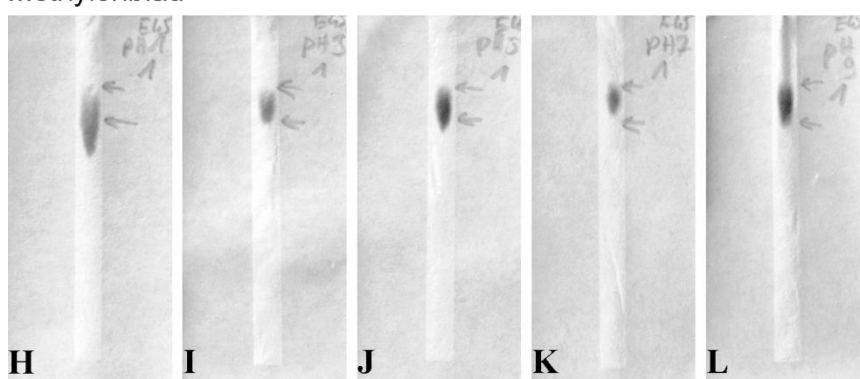


Abbildung 106: (A–G) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Tartrazinlösungen (4 mmol L^{-1} , 25 mS cm^{-1}) bei pH 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 (von links nach rechts). (H–L) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Methylenblaulösungen ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, 25 mS cm^{-1}) bei pH 1, 3, 5, 7, 9 (von links nach rechts).

Einfluss des pH-Werts von Wasser auf die Laufweite in mikrostrukturierten Kanälen

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Baumwollinterspapieren des Flächengewichts 45 g m^{-2} (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Als Fluid wird deionisiertes Wasser verwendet, das mit Salzsäure und Natronlauge auf pH 3, 5, 7, 9, 11 und 13 eingestellt wird. Anschließend wird mit Hilfe von Natriumchlorid die Leitfähigkeit aller Proben einheitlich auf 38 mS cm^{-1} eingestellt. Dann werden die Experimente, wie in Abschnitt 3.3.1 für Proteinexperimente beschrieben durchgeführt und die Laufweiten nach 12 min ermittelt. Für jeden pH-Wert wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten Laufweiten sind in Abbildung 107 aufgetragen.

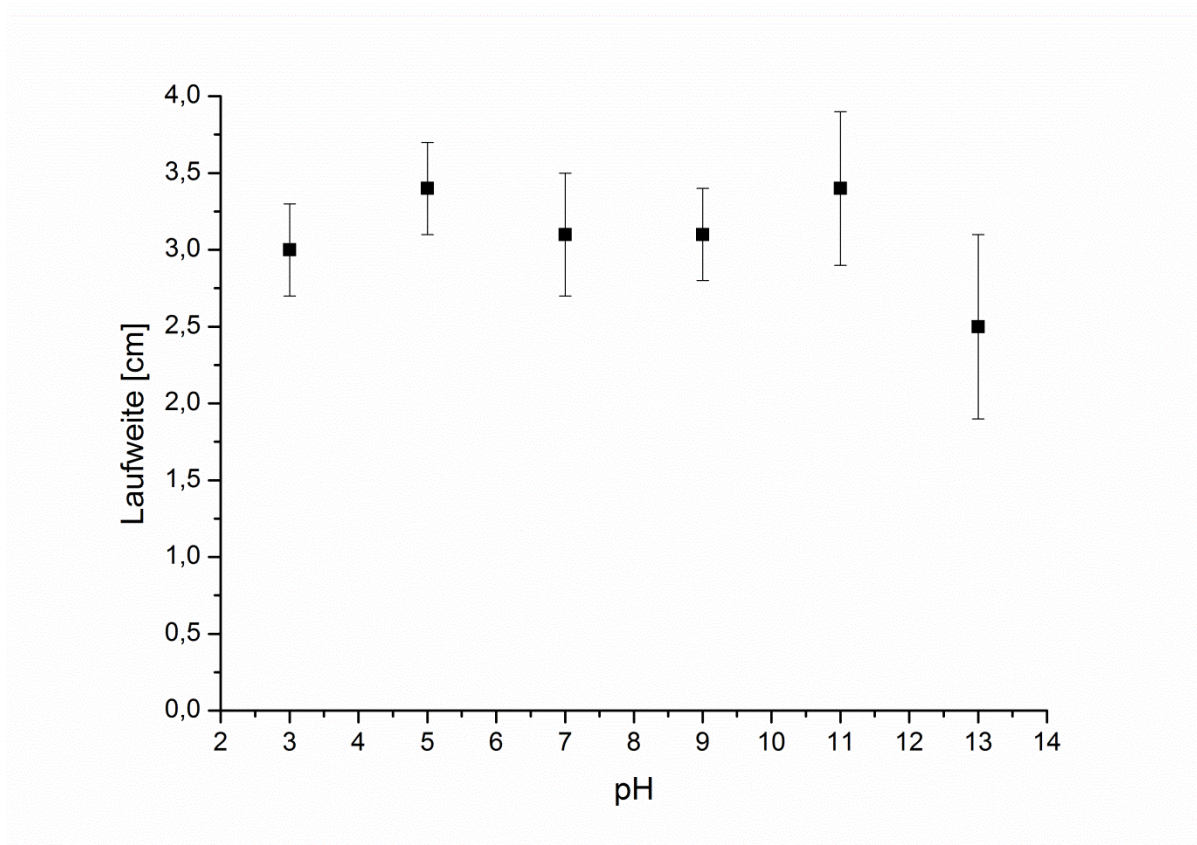


Abbildung 107: Einfluss des pH-Werts von Wasser auf die Laufweite in mikrostrukturierten Kanälen.

9.6.3. Einfluss der Leitfähigkeit

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Eukalyptussulfatpapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (SW129) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Fluid wird deionisiertes Wasser verwendet, das mit Natronlauge auf pH 7 eingestellt wird. Anschließend werden durch Zugabe von Natriumchlorid Proben mit drei verschiedenen Leitfähigkeiten (1 ; 25 ; $48,5 \text{ mS cm}^{-1}$) vorbereitet. Ebenso wird mit einer Tartrazinlösung der Konzentration 4 mmol L^{-1} , einer Methylenblaulösung der Konzentration $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ sowie einer Mischung beider Farbstoffe (4 mmol L^{-1} Tartrazin; $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ Methylenblau in deionisiertem Wasser) verfahren. Diese Lösungen dienen als Analytlösungen. Für alle drei Lösungen wird für jede Leitfähigkeit eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten Laufzeiten sind in Tabelle 19 und Tabelle 20 unter \bar{x} (Laufzeit) zusammengefasst. $\sigma(\bar{x})$ bezeichnet die zugehörige Standardabweichung nach Gleichung 12. \bar{x}_{ges} (Laufzeit) und $\sigma_{\text{ges}}(\bar{x})$ bezeichnen den Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung aus den Mittelwerten der Laufzeiten aller pH-Werte. Abbildung 56 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe jedes Farbstoffes für die verschiedenen Leitfähigkeiten.

Tabelle 19: Gemittelte Laufzeiten und zugehörige Standardabweichungen der Retentionsexperimente in Abhängigkeit der Leitfähigkeit für Tartrazin und Methylenblau.

	Tartrazin		Methylenblau	
Leitfähigkeit [mS cm ⁻¹]	\bar{x} (Laufzeit) [s]	σ (\bar{x}) [s]	\bar{x} (Laufzeit) [s]	σ (\bar{x}) [s]
1	115	5	105	5
25	125	5	118	6
48,5	121	7	114	7
\bar{x}_{ges} (Laufzeit) [s]	120		112	
σ (\bar{x}) [s]	5		7	

Tabelle 20: Gemittelte Laufzeiten und zugehörige Standardabweichungen der Retentionsexperimente in Abhängigkeit der Leitfähigkeit für die Mischung von Tartrazin und Methylenblau.

Leitfähigkeit [mS cm ⁻¹]	\bar{x} (Laufzeit) [s]	σ (\bar{x}) [s]
1	136	11
25	133	16
48,5	138	11
\bar{x}_{ges} (Laufzeit) [s]	136	
σ (\bar{x}) [s]	3	

Für ein Referenzexperiment werden die angesetzte Tartrazinlösung (4 mmol L⁻¹; pH 7; $\chi = 25$ mS cm⁻¹) und die angesetzte Methylenblaulösung (0,6 mmol L⁻¹; pH 7; $\chi = 25$ mS cm⁻¹) nacheinander im gleichen Kanal aufgetragen. Zunächst wird, sobald die Fluidfront 1,5 cm zurückgelegt hat, ein Tartrazinspot ($V = 0,5$ μ L) 0,5 cm hinter der Fluidfront aufgetragen. Sobald die Tartrazinfront 1 cm im Kanal zurückgelegt hat, wird ein Methylenblauspot ($V = 0,5$ μ L) aufgetragen. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Einfluss der Leitfähigkeit von Wasser auf die Laufweite in mikrostrukturierten Kanälen

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Baumwollinterspapieren des Flächengewichts 45 g m⁻¹ (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Als Fluid wird deionisiertes Wasser verwendet, das zunächst mit Salzsäure auf pH 6 und anschließend mit Natriumchlorid auf Leitfähigkeiten zwischen 0,001 und 243,7 mS cm⁻¹ eingestellt wird. Dann werden die Experimente, wie in Abschnitt 3.3.1 für Proteinexperimente beschrieben, durchgeführt und die Laufweiten nach 12 min ermittelt. Für jede Leitfähigkeit wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten Laufweiten sind in Abbildung 108 aufgetragen.

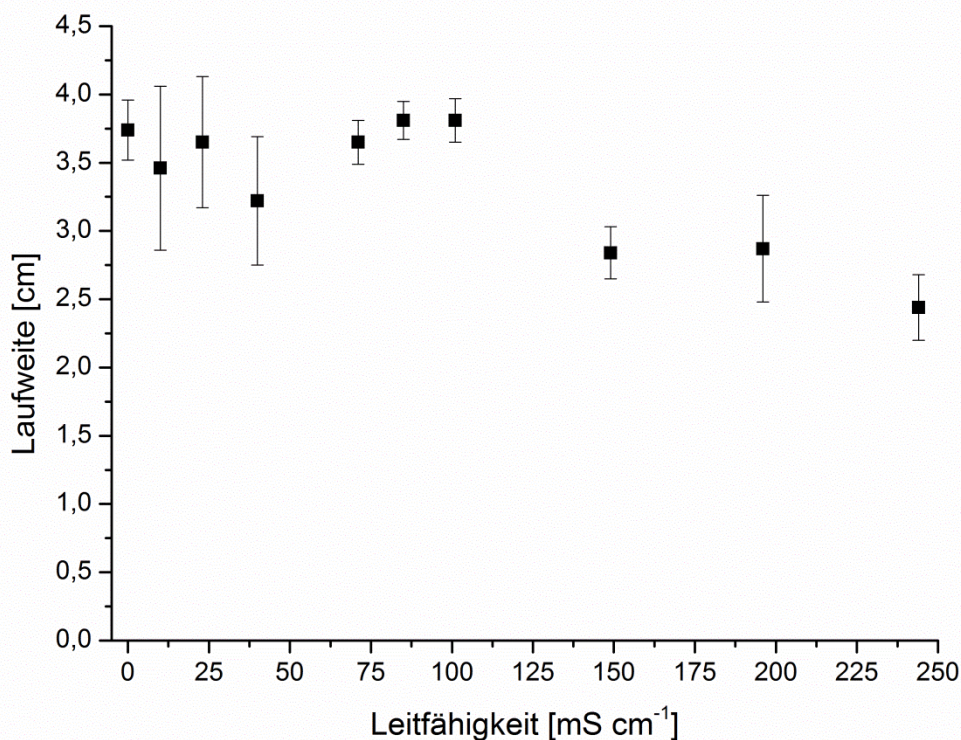


Abbildung 108: Einfluss der Leitfähigkeit von Wasser auf die Laufweite in mikrostrukturierten Kanälen.

9.6.4. Einfluss der Analytkonzentration

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Eukalyptussulfatpapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (SW129) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Fluid wird deionisiertes Wasser verwendet, das mit Natronlauge auf pH 7 mit Natriumchlorid auf eine Leitfähigkeit von 25 mS cm^{-1} eingestellt wird. Als Analytlösungen werden in gleicher Weise Farbstofflösungen von Tartrazin und Methylenblau in deionisiertem Wasser mit pH 7 und $\kappa = 25 \text{ mS cm}^{-1}$ hergestellt. Dabei werden für die Tartrazinlösungen Konzentrationen von 40, 4 und $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ und für die Methylenblaulösungen Konzentrationen von 60, 6, und $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ verwendet. Für jede Konzentration der Analytlösungen wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten Laufzeiten sind in Tabelle 21 unter \bar{x} (Laufzeit) zusammengefasst. $\sigma(\bar{x})$ bezeichnet die zugehörige Standardabweichung nach Gleichung 12. \bar{x}_{ges} (Laufzeit) und $\sigma_{\text{ges}}(\bar{x})$ bezeichnen den Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung aus den Mittelwerten der Laufzeiten aller Konzentrationen eines Farbstoffs. Abbildung 64 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe jedes Farbstoffes für jede Konzentration.

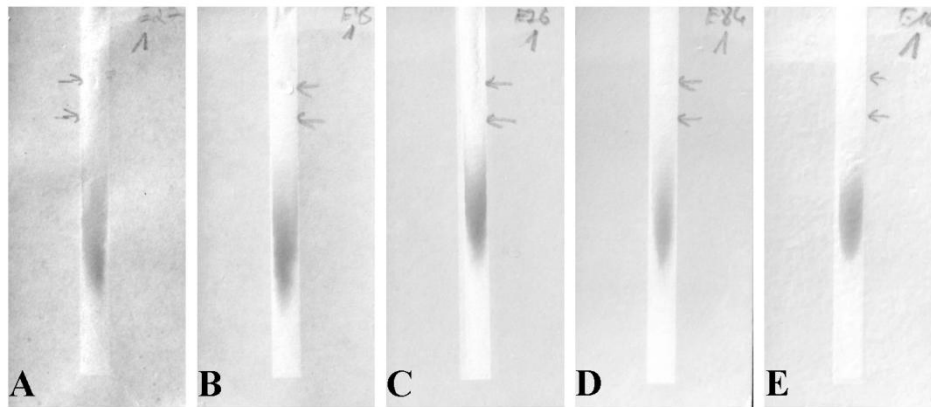
Tabelle 21: Gemittelte Laufzeiten und zugehörige Standardabweichungen der Retentionsexperimente in Abhängigkeit der Konzentration der Analytlösung für Tartrazin und Methylenblau.

	Tartrazin		Methylenblau	
Konzentration	\bar{x} (Laufzeit) [s]	σ (\bar{x}) [s]	\bar{x} (Laufzeit) [s]	σ (\bar{x}) [s]
Hoch	121	5	129	4
Mittel	126	4	145	2
Gering	130	6	131	15
\bar{x}_{ges} (Laufzeit) [s]	126		135	
σ (\bar{x}) [s]	5		9	

9.6.5. Einfluss der Papierdichte

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Eukalyptussulfatpapier mit fünf verschiedenen Flächengewichten (27 g m^{-2} (SW37), 45 g m^{-2} (SW129), 76 g m^{-2} (SW37), 84 g m^{-2} (SW37), 160 g m^{-2} (SW37)) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Fluid wird deionisiertes Wasser verwendet, das mit Natronlauge auf pH 7 und mit Natriumchlorid auf eine Leitfähigkeit von 25 mS cm^{-1} eingestellt wird. Ebenso wird mit einer Tartrazinlösung der Konzentration 4 mmol L^{-1} und einer Methylenblaulösung der Konzentration $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ verfahren, die als Analytlösungen dienen. Für jedes Flächengewicht wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten Laufzeiten sind in Tabelle 22 unter \bar{x} (Laufzeit) zusammengefasst. σ (\bar{x}) bezeichnet die zugehörige Standardabweichung nach Gleichung 12. \bar{x}_{ges} (Laufzeit) und σ_{ges} (\bar{x}) bezeichnen den Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung aus den Mittelwerten der Laufzeiten aller Flächengewichte. Abbildung 109 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe jedes Farbstoffes für jedes Flächengewicht.

Tartrazin



Methylenblau

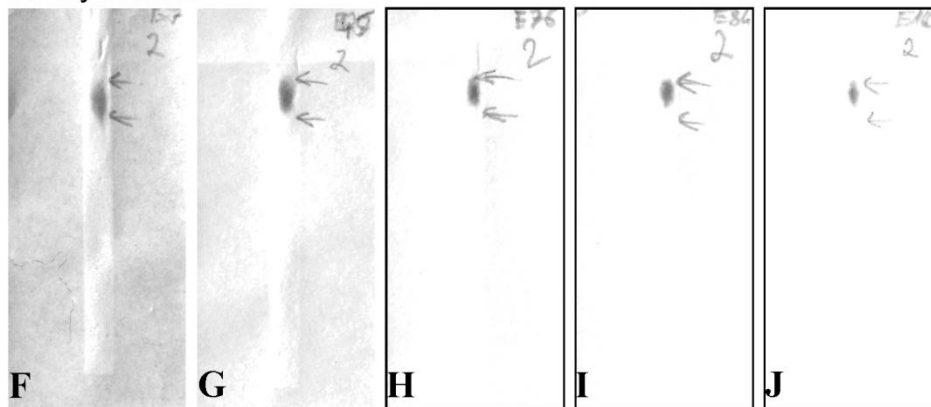


Abbildung 109: (A–E) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Tartrazinlösungen ($\text{pH } 7$, 25 mS cm^{-1} , 4 mmol L^{-1}) in Substraten mit Flächengewichten von 27 , 45 , 76 , 84 , 160 g m^{-2} (von links nach rechts). (F–J) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Methylenblaulösungen ($\text{pH } 7$, 25 mS cm^{-1} , $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) in Substraten mit Flächengewichten von 27 , 45 , 76 , 84 , 160 g m^{-2} (von links nach rechts).

Tabelle 22: Gemittelte Laufzeiten und zugehörige Standardabweichungen der Retentionsexperimente in Abhängigkeit der Papierdichte für Tartrazin und Methylenblau.

	Tartrazin		Methylenblau	
Papierdichte [kg m^{-3}]	\bar{x} (Laufzeit) [s]	σ (\bar{x}) [s]	\bar{x} (Laufzeit) [s]	σ (\bar{x}) [s]
493,8	191	36	140	19
518,1	143	17	123	4
555,1	213	22	197	6
564,8	208	4	205	6
568,6	228	10	220	21
\bar{x}_{ges} (Laufzeit) [s]	197		177	
σ (\bar{x}) [s]	33		43	

9.6.6. Einfluss des Papiertyps

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus drei verschiedenen Papiersubstraten hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Verwendet werden handgebildete Blätter aus Eukalyptussulfatfasern (SW37) sowie Baumwolllintersfasern (SW 29) mit jeweils einem Flächengewicht von 84 g m^{-2} . Außerdem kommerziell erhältliches Roth 15A Filterpapier, das ebenfalls ein Flächengewicht von 84 g m^{-2} aufweist. Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Fluid wird deionisiertes Wasser verwendet, das mit Natronlauge auf pH 7 und mit Natriumchlorid auf eine Leitfähigkeit von 25 mS cm^{-1} eingestellt wird. Ebenso wird mit einer Tartrazinlösung der Konzentration 4 mmol L^{-1} und einer Methylenblaulösung der Konzentration $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ verfahren. Diese Lösungen dienen als Analytlösungen. Für alle drei Papiersorten wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten Laufzeiten sind in Tabelle 23 unter \bar{x} (Laufzeit) zusammengefasst. $\sigma(\bar{x})$ bezeichnet die zugehörige Standardabweichung nach Gleichung 12. \bar{x}_{ges} (Laufzeit) und $\sigma_{\text{ges}}(\bar{x})$ bezeichnen den Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung aus den Mittelwerten der Laufzeiten aller drei Papiersorten. Abbildung 110 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe jedes Farbstoffes für jeden Papiertyp.

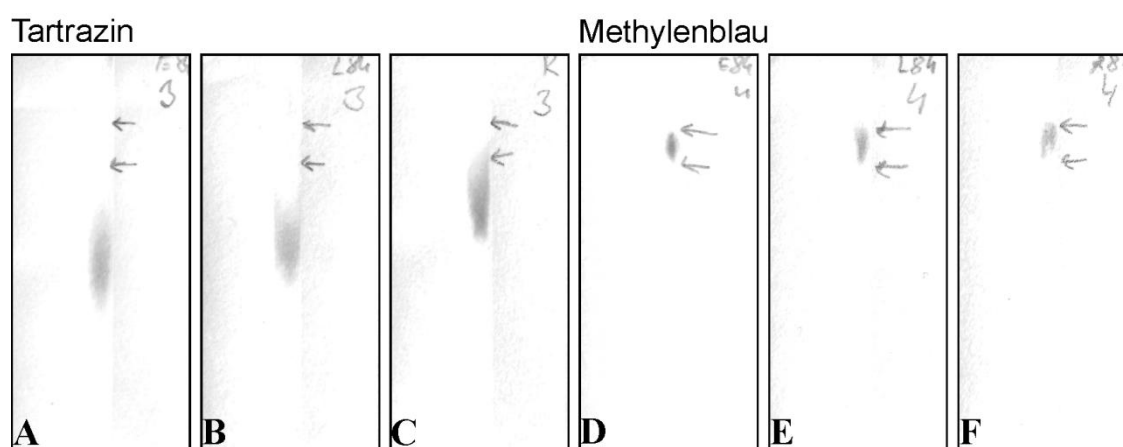


Abbildung 110: (A–C) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Tartrazinlösungen ($\text{pH } 7$, 25 mS cm^{-1} , 4 mmol L^{-1}) in Substraten aus Eukalyptussulfatfasern, Baumwolllintersfasern und kommerziell erhältlichem Roth 15A Filterpapier mit jeweils einem Flächengewicht von 84 g m^{-2} (von links nach rechts). (D–F) Exemplarische Graustufenscans der Retentionsexperimente für Methylenblaulösungen ($\text{pH } 7$, 25 mS cm^{-1} , $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) in Substraten aus Eukalyptussulfatfasern, Baumwolllintersfasern und kommerziell erhältlichem Roth 15A Filterpapier mit jeweils einem Flächengewicht von 84 g m^{-2} (von links nach rechts).

Tabelle 23: Gemittelte Laufzeiten und zugehörige Standardabweichungen der Retentionsexperimente in Abhängigkeit des Papiertyps für Tartrazin und Methylenblau.

	Tartrazin		Methylenblau	
Papiertyp	$\bar{x} \text{ (t)}$ [s]	$\sigma \text{ (t)}$ [s]	$\bar{x} \text{ (t)}$ [s]	$\sigma \text{ (t)}$ [s]
Eukalyptussulfat	217	28	188	2
Baumwolllinters	730	20	681	12
Roth 15A Filterpapier	1356	130	1183	63
$\bar{x}_{\text{ges}} \text{ (t) [s]}$	768		684	
$\sigma(\bar{x}) \text{ [s]}$	570		497	

9.7. Experimente zur gezielten, ortsspezifischen Retention der Modellkomponente Tartrazin in mikrostrukturiertem Papier

9.7.1. Polymeranalogen Umsetzung (PU) von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) auf Papiersubstraten

Die heterogene polymeranaloge Umsetzung von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) mit AEMAC wird mit verschiedenen Methoden untersucht. Im Folgenden ist jeweils kurz die Probenvorbereitung und Detektion der jeweiligen Methode beschrieben.

FTIR-Spektren

Zur Analyse mittels FTIR-Spektroskopie werden drei Abschnitte eines Eukalyptussulfatpapier (45 g m⁻²) vorbereitet. Einer dieser Abschnitte dient als Referenz für unmodifiziertes Papier und wird folglich unmodifiziert vermessen. Die beiden anderen Abschnitte werden photolithographisch mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) beschichtet. Nur einer dieser beiden Abschnitte wird anschließend noch mit AEMAC modifiziert (Abschnitt 9.3.5). Proben und Referenz werden im FTIR-Spektrometer bei einer Anpresskraft von ca. 70 N durch zehnfache Akkumulation des aufgenommenen Spektrums unter Abzug eines Backgroundsignals vermessen.

Ladungstitration

Zur Probenvorbereitung werden zunächst Streifen aus Eukalyptussulfatpapier (46,8 g m⁻²) zugeschnitten und mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-beschichtet (Abschnitt 9.5.2). So behandelte Papiere dienen als Referenz. Als Probe wird beschichtetes Papier anschließend noch in einer AEMAC-Lösung modifiziert (Abschnitt 9.7.1). Nach einer Äquilibrierung unter Normklima werden die in Abschnitt 6.1.2 in Tabelle 10 notierten Massen für Referenz und Probe in jeweils ein Falcontube eingewogen und aufgrund der zu erwartenden positiven bzw. neutralen Ladung der modifizierten Fasern mit 15 mL 0,001 M PES-Lösung versetzt. Nach Inkubation unter Schütteln (480 rpm) über Nacht werden Faserreste sanft abzentrifugiert, um 10 mL reinen Überstand zu erhalten. Dieser wird in die Messzelle eines Partikelladungsdetektors (PCD) überführt und mit einer 0,001 M PDADMAC-Lösung in 0,1 mL Schritten rücktitriert. Zum Vergleich wird darüber hinaus 10 mL reine PES-Lösung titriert. Zur Ermittlung der verbrauchten Volumina am Äquivalenzpunkt werden die Titrationskurven (Abbildung 82) angefügt. Gleichung 20 wird zur Berechnung der Ladungsmenge herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 in Abschnitt 6.1.2 vergleichend dargestellt und diskutiert.

XPS-Spektrum

Zur Analyse mittels XPS-Spektroskopie werden zwei 2,5 x 2,5 cm Quadrate aus Eukalyptussulfatpapier (45 g m⁻²) zurechtgeschnitten. Eines dieser Quadrate dient als Referenz und wird mit P(DMAA-co-MABP) beschichtet (Abschnitt 9.5.1). Das andere Quadrat wird zunächst photolithographisch mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) beschichtet und anschließend mit AEMAC modifiziert (Abschnitt 9.7.1).

Bei der Messung von Papierproben im XPS-Spektrometer ist zu beachten, dass die Proben in einem Winkel von 50° mit einer Torsion von 16° gemessen werden sollten. In Vorexperimenten bei planaren Probengeometrien ist eine starke Aufladung der Proben während der Messung beobachtet worden. Diese äußert sich in unterschiedlichen Bindungsenergien der Kohlenstoffpeaks zu Beginn und am Ende der Messung und kann zu fehlerhaften Messergebnissen führen. Die Aufladung liegt

darin begründet, dass durch die raue Oberfläche der Proben bestimmte Bereiche der Oberfläche nicht bestrahlt werden. Sie liegen "im Schatten" der Oberflächenstrukturen. Durch die Messung unter der beschriebenen Probengeometrie kann ein "Schattenwurf" minimiert und so eine Aufladung verhindert werden.

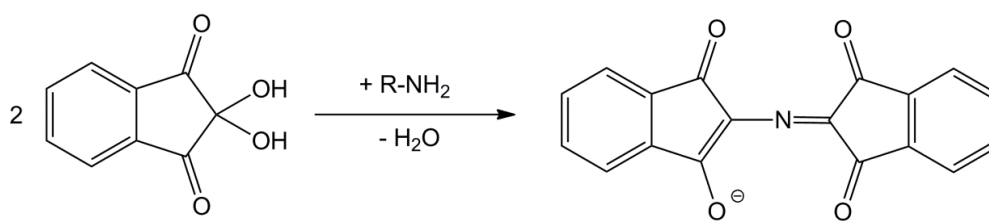
Der Kohlenstoff-Peak als Referenz wird auf 286,7 eV statt den üblichen 285 eV festgesetzt, da der Hauptanteil, der in der Probe enthaltenen Kohlenstoffatome, in der Cellulose lokalisiert ist. Die Kohlenstoffatome der Cellulose weisen eine Bindung zu einem Sauerstoffatom auf und sind daher nach Literatur zu höheren Bindungsenergien verschoben als Kohlenstoffatome in Alkanen.^[160]

Fluoreszenzmikroskopie

In Vorexperimenten werden als Referenzen zunächst methanolische Lösungen von P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP) mit einer Konzentration von 15 bzw. 20 mg mL⁻¹, Fluoresceinamin mit einer Konzentration von 0,05 mmol L und Aminoethylrhodamin B mit einer Konzentration von 0,2 mmol L hergestellt. Diese werden anschließend im Fall von Fluoresceinamin optisch und im Fall von Aminoethylrhodamin B durch die Aufnahme von UV-VIS-Spektren mit gemischten Probelösungen von Polymer und Farbstoff verglichen. Diese Probelösungen weisen dabei äquivalente Konzentrationen an Polymer und Farbstoff wie die zugehörigen Referenzlösungen auf. Die Referenzen und Probe zur Analyse der spezifischen Anbindung von Aminoethylrhodamin B über die primäre Aminfunktion an die N-Hydroxy-Succinimidfunktion im Polymer werden wie folgt präpariert. Zunächst werden drei gleiche Teile eines Eukalyptussulfatpapiers zugeschnitten. Einer dieser Abschnitte wird photolithographisch (Abschnitt 9.5.1) mit P(DMAA-co-MABP) beschichtet, ein anderer mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP). Der dritte Abschnitt bleibt unbeschichtet. Alle drei Abschnitte werden anschließend für 24 h in einer methanolischen Aminoethylrhodamin B Lösung einer Konzentration von 0,02 mmol mL inkubiert. Da der pH-Wert der Lösung direkt im basischen Bereich bei pH 8,8 liegt, wird er nicht extra eingestellt. Anschließend werden die Referenzen und Probe für 6 h mit MeOH extrahiert. Vor der Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop werden die Proben für ca. 15 min unter der UV-Laborlampe mit 365 nm bestrahlt, um den Übergang des Aminoethylrhodamin B-Moleküls in den fluoreszenten Zustand zu induzieren (Schäfer *et al.*^[161]). Die anschließende Analyse erfolgt direkt im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop bei zweifacher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 5 ms durch den SWG-Filter.

9.7.2. Negativkontrolle zur Anbindung von AEMAC

Um einen funktionalen Nachweis der erfolgreichen PU der in P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) enthaltenen NHS-Estern mit AEMAC zu führen, muss zunächst belegt werden, dass AEMAC nicht unspezifisch an unbeschichtetes oder polymerbeschichtetes Papier bindet bzw. es muss ermittelt werden, wie lange extrahiert werden muss, um unspezifisch gebundenes AEMAC vollständig zu entfernen. Freie primäre Amingruppen unspezifisch gebundener AEMAC-Moleküle sollen dabei zunächst in einem Ninhydrintest auf Baumwolllinterspapier nachgewiesen werden. Ninhydrin reagiert in Anwesenheit von primären Aminen zu einem violett/braunen Farbstoff (Ruhmanns Purpur)^[183], der auf weißem Papiersubstrat gut zu detektieren ist (Abbildung 111).



Ruhmanns Purpur

Abbildung 111: Schema der Reaktion von Ninhydrin mit primären Aminen zum violett/braunen Ruhmanns Purpur.^[183]

Eine Vorgehensweise zur Anfärbung primärer Amine, basierend auf der von Bleay *et al.*^[184] publizierten Methode zur Detektion von Fingerabdrücken, ist in Vorexperimenten für die Anwendung auf Papiersubstraten optimiert worden. Dazu wird zunächst eine Stammlösung von 2,5 g Ninhydrin (2,2-Dihydroxyindane-1,3-dion), 22,5 mL Ethanol, 1 mL Ethylacetat und 2,5 mL Eisessig angesetzt. Diese wird verdünnt (5,2 mL Lösung auf 100 mL Ethanol) und auf Proben aufgesprüht, die anschließend für 30 min im Trockenschrank bei 100 °C inkubiert werden. Mit der beschriebenen Methoden kann in Referenzexperimenten auf Eukalyptussulfatpapier eine BSA-Lösungen mit einer Konzentration von 10 ng mL⁻¹ detektiert werden. Auf Baumwolllinters ist immerhin noch eine Konzentration von 10 µg mL⁻¹ schwach sichtbar. Bei Ausbleiben einer violett bis braunen Färbung so behandelte Proben kann, im Rahmen der beschriebenen Nachweisgrenzen dieses Tests, die Anwesenheit unspezifisch gebundener AEMAC-Moleküle ausgeschlossen werden.

Zur Analyse der benötigten Extraktionszeit, um unspezifisch gebundene AEMAC-Moleküle aus unbeschichteten und polymerbeschichteten Papierproben zu entfernen, werden zunächst Papierproben (Baumwolllinters, 76 g m⁻²) auf 2,5 x 2,5 cm große Quadrate zugeschnitten. Die Hälfte dieser Proben werden photolithographisch mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) beschichtet (Abschnitt 9.5.2), die andere Hälfte unbeschichtet weiterverwendet. Anschließend werden alle Proben mit Ausnahme jeweils einer Probe als Referenz dem üblichen Vorgehen zur Modifikation mit AEMAC unterzogen (Abschnitt 9.5.3). Konkret werden sie 24 h in einer methanolischen AEMAC-Lösung (c = 0,2 mmol mL⁻¹) bei 160 rpm geschüttelt. Daraufhin werden sie für 0 bis 210 min in einer Soxhlet-Extraktion mit Methanol behandelt und nach 0, 60, 120, 180 und 210 min jeweils eine Probe entnommen. Diese Proben werden anschließend mittels eines Ninhydrintests auf unspezifisch gebundenes AEMAC untersucht.

Nach 120–180 min Extraktion können kolorimetrisch weder auf unbeschichtetem noch auf polymerbeschichtetem Papier primäre Amingruppen nachgewiesen werden. Folglich kann im Rahmen der Detektionsgrenze des Ninhydrinnachweises davon ausgegangen werden, dass kein unspezifisch gebundenes AEMC mehr vorhanden ist (Abbildung 112). Als Extraktionszeit von AEMAC nach Modifikation von mit P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA) beschichteten Proben werden 180 min definiert.

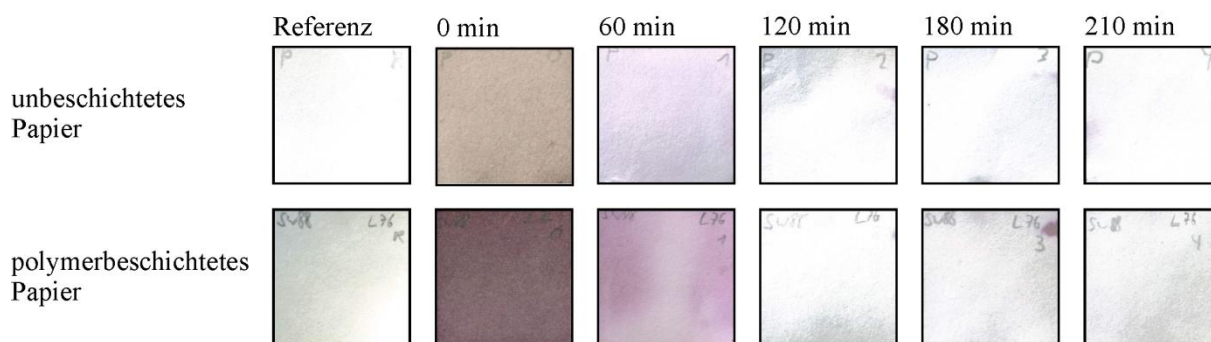


Abbildung 112: Fotografien der Referenzen und Proben unbeschichteter (oben) und polymerbeschichteter (unten) Papiere nach der Ninhydrinfärbung. Die Referenzen zeigen keine Färbung. Bei den Proben nimmt die Färbung mit zunehmender Extraktionszeit ab, da unspezifisch gebundenes AEMAC mehr und mehr herausgelöst wird. Nach ca. 120–180 min kann im Rahmen der Detektionsgrenze des Ninhydrintests eine vollständige Extraktion beobachtet werden.

Exemplarisch soll diese Untersuchung für unbeschichtetes Papier auch in Eukalyptussulfatpapier bestätigt werden. Dazu werden einerseits reines Papier und andererseits unbeschichtetes, mit AEMAC behandeltes und drei Stunden extrahiertes Papier (Abschnitt 9.5.3) mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) analysiert (Abbildung 113). Die Elementkonzentrationen beider Proben werden vergleichend untersucht (Tabelle 24). Da basierend auf den Voruntersuchungen mit Ninhydrin an unbeschichtetem Papier nach drei Stunden Extraktion weder eine spezifische noch eine unspezifische Anbindung von AEMAC erwartet wird, soll die Stickstoffkonzentration beider Proben unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1–2,0 atom%^[160] liegen. Dies kann im Rahmen des Fehlers bestätigt werden.

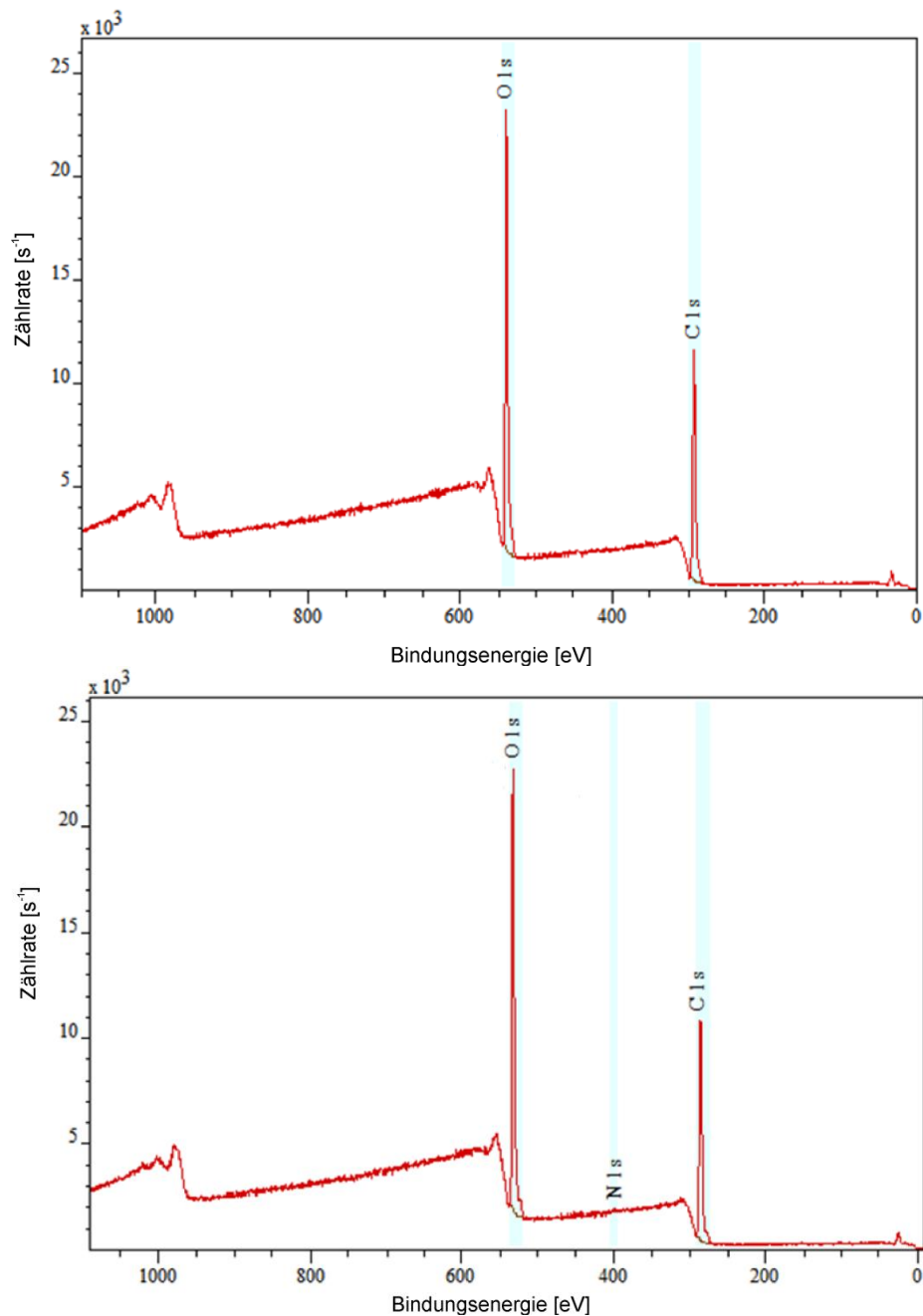


Abbildung 113: XPS-Spektren zur Ermittlung der Elementkonzentrationen für reines Papier aus Eukalyptussulfatfasern als Referenz (oben) sowie zuvor in methanolischer AEMAC-Lösung inkubiertes und anschließend extrahiertes Papier als Probe (unten).

Tabelle 24: Elementkonzentrationen aus XPS-Messungen für reines Eukalyptussulfatpapier (Referenz) sowie zuvor in methanolischer AEMAC-Lösung inkubiertes und anschließend extrahiertes Papier (Probe). Die zugrunde liegenden Messdaten sind in Abbildung 113 aufgetragen.

Element	Elementkonzentration Referenz [at.-%]	Elementkonzentration Probe nach 180 min Extraktion [at.-%]
C	56,4	54,6
O	43,6	45,3
N	–	0,1

Anhand dieser Untersuchungen kann abschließend festgestellt werden, dass durch eine dreistündige Extraktion aus Methanol unspezifisch gebundenes AEMAC aus Papierproben vollständig entfernt werden kann. Wird nun in Abschnitt 6.2 eine erhöhte Retention von negativ geladenem Farbstoff in ortsspezifisch modifizierten, mikrostrukturierten Papiersubstraten detektiert, kann ausgeschlossen werden, dass diese auf unspezifisch gebundene positive Ladungen zurückzuführen ist.

9.7.3. *Proof-of-concept*-Experiment für die gezielte, ortsspezifische Retention von Tartrazin in Papier

Zur Probenvorbereitung wird zunächst Eukalyptussulfatpapier mit einem Flächengewicht von 45 g m^{-2} in Form eines hydrophilen, geraden Kanals mikrostrukturiert (Abschnitt 9.5.1). So strukturierte Papiersubstrate dienen direkt als Proben "ohne Polymer". Als zweite Referenz werden Proben mit "nicht umgesetzten", also ungeladenem, P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patches vorbereitet (Abschnitt 9.5.2). Proben der Kategorie "in Lösung umgesetzt" bestehen aus mikrostrukturierten Kanälen in die Polymerpatches aus P(DMAA-co-AEMAC-co-MABP-co-PyMA) eingebracht werden (Abschnitt 9.5.2). "Heterogen umgesetzte" Proben schließlich werden nach der Einbringung mikrostrukturierter Kanäle noch in zwei weiteren Schritten bearbeitet. Zunächst wird ein P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patch eingebracht (Abschnitt 9.5.2), der anschließend modifiziert wird (Abschnitt 9.5.3). Alle eingebrachten Patches sind 2 cm lange und beginnen 1,5 cm nach der Kanalöffnung.

Die Experimente werden, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Als Fluid wird deionisiertes Wasser mit einem pH-Wert von 7 und einer Leitfähigkeit von 25 mS cm^{-1} verwendet. Die gespottete Tartrazinlösung hat eine Konzentration von 4 mmol L^{-1} . Es wird eine Dreifachbestimmung jeder Probe durchgeführt. Die Laufzeiten der Kanäle (Tabelle 25) variieren vor allem zwischen den Proben mit und ohne Polymerpatch verhältnismäßig stark. Dies entspricht den Erwartungen. Das Einbringen von Polymer verändert entscheidende Parameter der Lucas-Washburn basierten Beziehungen (Abschnitt 3.1.4) und lässt damit eine variierende Strecke pro Zeiteinheit erwarten. Dies hat in diesem Versuchsaufbau eine geänderte Laufzeit zur Folge (Kapitel 5). Die quantitative Auswertung der Proben (Abbildung 87) erfolgt anhand des patchlängen normierten Retentionsfaktors R_f (Patch) (Gleichung 22).

Tabelle 25: Laufzeiten der *Proof-of-Concept*-Experimente zur gezielten, ortsspezifischen Retention von Tartrazin in Papier.

	Laufzeit t [s]			
Probe	ohne Polymer	nicht umgesetzt	in Lösung umgesetzt	Heterogen umgesetzt
1	117	162	184	180
2	140	177	157	164
3	168	204	165	216
4	134	–	183	178
$\bar{x} \text{ (t) [s]}$	140	181	172	185
$\sigma \text{ (t) [s]}$	21	21	13	22

9.7.4. Aufkonzentration von Tartrazin in μ PADs

Zur Probenvorbereitung wird zunächst Eukalyptussulfatpapier mit einem Flächenwicht von 45 g m^{-2} in Form eines hydrophilen, geraden Kanals mikrostrukturiert (Abschnitt 9.5.1). So strukturierte Papiersubstrate dienen direkt als Proben "ohne Polymer". Als zweite Referenz werden Proben mit

"nicht umgesetzt", also ungeladenem, P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patches vorbereitet (Abschnitt 9.5.2). "Heterogen umgesetzte" Proben schließlich werden nach der Einbringung mikrostrukturierter Kanäle noch in zwei weiteren Schritten bearbeitet. Zunächst wird ein P(DMAA-co-MAC₂AE-co-MABP-co-PyMA)-Patch eingebracht (Abschnitt 9.5.2), der anschließend modifiziert wird (Abschnitt 9.5.3). Alle eingebrachten Patches sind 1 cm lang und beginnen 1,0 cm nach der Kanalöffnung.

Verdünnte Tartrazinlösungen der Konzentrationen (0,3; 0,15; 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$) werden auf pH 7 und eine Leitfähigkeit von 25 mS cm^{-2} eingestellt und als Fluidreservoir mit dem Kanalanschluss kontaktiert. Der Versuchsaufbau erfolgt dabei unter Normklimabedingungen äquivalent wie in Abschnitt 3.3.1 in Abbildung 30 dargestellt. Die Laufzeiten der einzelnen Proben werden festgehalten. Als Start der Zeitnahme wird der Zeitpunkt der Kontaktierung definiert. Beendet wird sie, sobald die Fluidfront das Kanalende erreicht hat (Tabelle 26).

Tabelle 26: Laufzeiten der Experimente zur Aufkonzentration von Tartrazin in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration.

Farbstoffkonzentration	Laufzeit t [s]		
	ohne Polymer	nicht umgesetzt	heterogen umgesetzt
0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	129	143	154
0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	127	122	113
0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$	109	181	151
\bar{x} (t) [s]	122	149	139
σ (t) [s]	11	30	23

Die Laufzeiten der Kanäle variieren vor allem zwischen den Proben mit und ohne Polymerpatch verhältnismäßig stark. Dies entspricht den Erwartungen. Das Einbringen von Polymer verändert entscheidende Parameter der Lucas-Washburn basierten Beziehungen (Abschnitt 3.1.4) und lässt damit eine variierende Strecke pro Zeiteinheit erwarten. Dies hat in diesem Versuchsaufbau eine geänderte Laufzeit zur Folge (Kapitel 5).

Die Auswertung der Proben erfolgt nach Digitalisierung der Proben durch einen herkömmlichen Officescanner anhand der Software *Image J-2x*. Dazu wird aus den Bildern zunächst der blaue Farbkanal herausgefiltert (Abbildung 114). Anschließend wird der mittlere Grauwert (MGV) des ersten Millimeters des Patches bzw. in der Kanalstruktur ohne Polymerpatch des entsprechenden Bereichs (Area: 0,005) mit Hilfe der Software ermittelt und vergleichend aufgetragen (Abbildung 91 in Abschnitt 6.3). Als Fehler wird die Standardabweichung des ermittelten Grauwerts definiert.

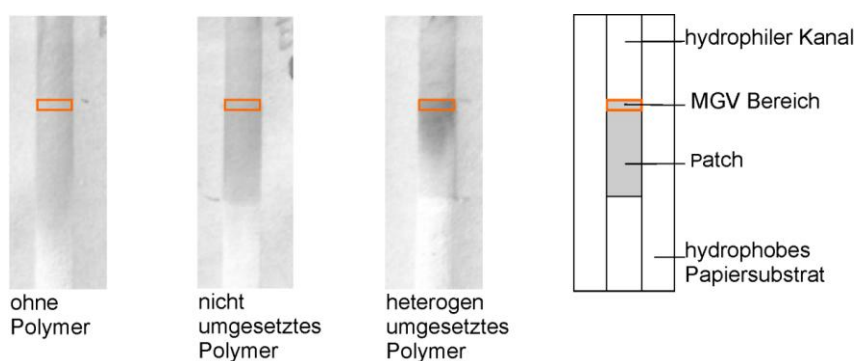


Abbildung 114: Ausschnitte der Patchstrukturen für Proben einer Tartrazinlösungskonzentration von 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Von links nach rechts: ohne Polymer, nicht umgesetztes Polymer, heterogen umgesetztes Polymer, schematische Darstellung eines entsprechenden Kanalausschnitts. Orangefarbene Rechtecke symbolisieren den Bereich, der zur Bestimmung des MGVs genutzt wurde.^[132]

9.8. Retentionsexperimente der Proteine

Der Versuchsaufbau, die Durchführung sowie Datenerhebung und Auswertung der Retentionsexperimente des Proteins IL-8-TAMRA ist in Abschnitt 3.3.1 detailliert beschrieben. Anhand dieser Vorgehensweise wurde der Einfluss auf das Retentionsverhalten in Abhängigkeit verschiedener Parameter der fluiden Phase und des Substrats untersucht. Konkret werden der Einfluss des pH-Werts, der Leitfähigkeit, der Proteinkonzentration sowie der Art des Laufmittels in Form verschiedener Puffersysteme und organischer Lösungsmittel für die fluide Phase untersucht. Das Papiersubstrat wird durch Modifikation mit P(DMAA-co-MABP) bzw. adsorbiertem Rinderserumalbumin (BSA) modifiziert.

9.8.1. Einfluss des pH-Werts

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Baumwollinterspapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Laufmittel werden Puffer verschiedener Zusammensetzung mit pH 3, 5, 7, 9, 11, 13 verwendet (Pufferzusammensetzungen: Tabelle 27).

Tabelle 27: Zusammensetzung, pH-Wert und Leitfähigkeit der verschiedenen verwendeten Puffersysteme.

pH	Komponente (Konzentration)	χ [mS cm ⁻¹]
3	Citronensäure (40,3 mM), Natriumchlorid (59,7 mM), Natriumhydroxid (20,6 mM)	7,97
5	Citronensäure (96,4 mM), Natriumhydroxid (19,6 mM)	12,72
7	Kaliumdihydrogenphosphat (25,9 mM), Dinatriumhydrogenphosphat (40,8 mM)	7,95
9	Natriumtetraborat (12,5 mM), Salzsäure (4,6 mM)	2,22
11	Glycin (104,6 mM), Natriumchlorid (104,6 mM), Natriumhydroxid (10,0 mM)	17,16
13	Glycin (10,5 mM), Natriumchlorid (8,0 mM), Natriumhydroxid (20,0 mM)	51,7

Als Analytlösung werden jeweils $0,5 \mu\text{L}$ einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) in Puffer C (Zusammensetzung: $c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ mM}$) aufgetragen. Abbildung 94 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe für jeden untersuchten pH-Wert.

Für jeden pH-Wert wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegten Strecken d_{Fluid} sind in Abbildung 115 aufgetragen. Wie in Abschnitt 7.2.1 bereits erwähnt, wird eine Abhängigkeit der zurückgelegten Strecke vom pH-Wert beobachtet.

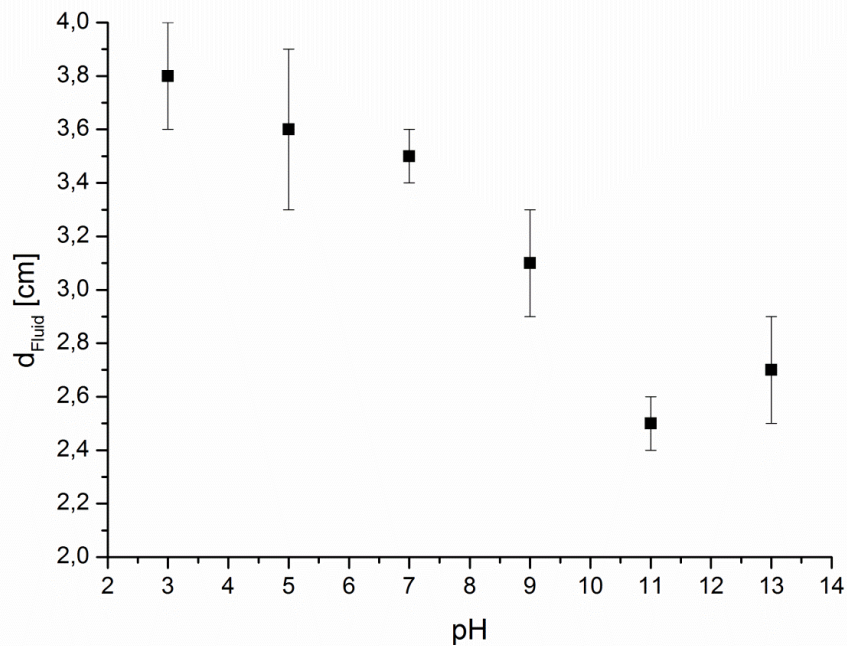


Abbildung 115: Während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegte Strecke d_{Fluid} als Funktion des pH-Wertes für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: verschiedene Puffer mit pH 3, 5, 7, 9, 11, 13. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwolllinters.

In Abbildung 116 ist die Bandenverbreiterung des Proteinspots in Abhängigkeit des pH-Wertes des Laufmittels aufgetragen.

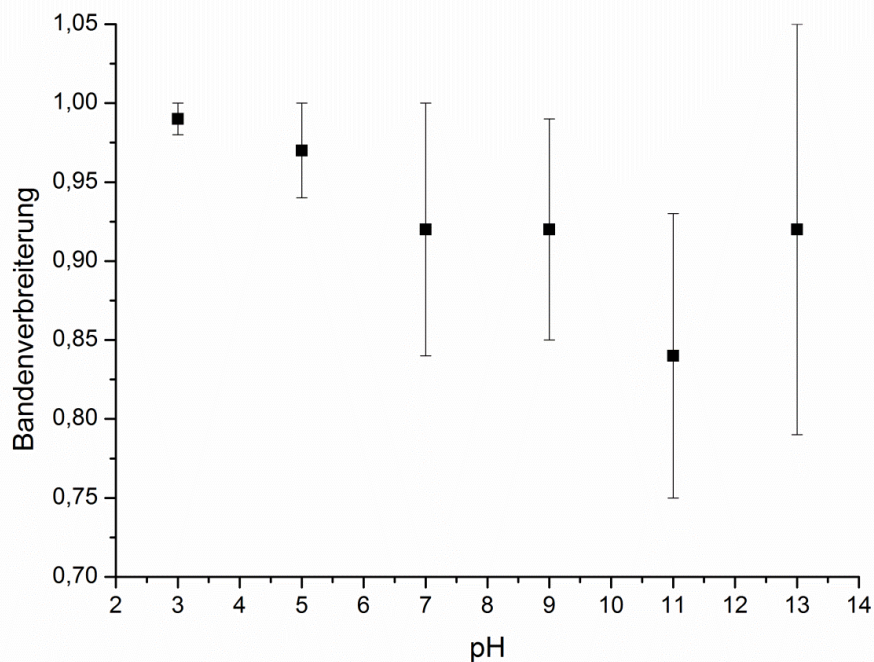


Abbildung 116: Bandenverbreiterung als Funktion des pH-Wertes für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: verschiedene Puffer mit pH 3, 5, 7, 9, 11, 13. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwolllinters.

9.8.2. Wasserbasierte Fluide: Fluoreszierende Fluidfront

Im folgenden Abschnitt soll auf eine Beobachtung (aus Abschnitt 7.2.1 und 7.2.2) kurz genauer eingegangen werden. Wie beispielsweise in Abbildung 94 deutlich wird, zeigen alle nach den Experimenten unter dem UV-Transilluminator betrachteten Proben eine Fluoreszenz am Ende der getrockneten Laufront des Fluides. Die Herkunft dieser Fluoreszenz ist nicht bekannt und wird deshalb genauer untersucht.

Durch Blindversuche (Experimente ohne Analyt bzw. Experimente in durch *Cutting* mikrostrukturierten Kanälen) kann ausgeschlossen werden, dass die fluoreszierende Fluidfront von gelösten Stoffen des Analyten oder der Polymerwand herrührt. Eine Extraktion der mikrostrukturierten Kanäle in Wasser vor dem Fluidtransport führt zu einer starken Abschwächung der Fluoreszenz der Fluidfront. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem fluoreszierenden Stoff um eine Verunreinigung im Papier handelt. Daraufhin wird durch gezielten Fluidtransport möglichst viel des löslichen fluoreszierenden Stoffes eines Papiers in einem Papierbereich aufkonzentriert. Dieser Papierbereich wird anschließend einer Elementaranalyse unterzogen und mit Ergebnissen eines Referenzpapiers verglichen. Die Daten sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Messergebnisse der Elementaranalyse (CHN) von Baumwollinterspapier (Referenz) sowie Baumwollinterspapier, in dem der lösliche, fluoreszierende Stoff zuvor aufkonzentriert wurde (Probe).

	Referenz	Probe
Kohlenstoffgehalt [%]	42,59	42,91
Wasserstoffgehalt [%]	6,46	6,38
Stickstoffgehalt [%]	0,00	0,00

Die Elementkonzentrationen von Referenz und Probe unterscheiden sich nur im Rahmen der Messfehler voneinander. Damit kann kein Unterschied in der chemischen Zusammensetzung der Referenz und der Probe detektiert werden, der einen Hinweis auf die Natur des unbekannten, löslichen, fluoreszierenden Stoffes liefert. Abschließend kann festgehalten werden, dass es sich bei dem fluoreszierenden Stoff an der Fluidfront um einen wasserlöslichen, intrinsisch im Baumwollinterspapier enthaltenen Stoff handelt. Dieser konnte allerdings basierend auf den vorhandenen Daten nicht weiter definiert werden.

9.8.3. Einfluss der Leitfähigkeit

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Baumwollinterspapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Laufmittel wird Puffer C mit verschiedenen Leitfähigkeiten verwendet. Dazu wird das Verhältnis der eingesetzten Salze (1:0,875) konstant gehalten. Der pH-Wert wird einheitlich mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt. Die genaue Pufferzusammensetzung und resultierende Leitfähigkeiten sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Zusammensetzung und resultierende Leitfähigkeit der eingesetzten Laufmittel.

Benennung	$c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$ [mM]	c_{NaCl} [mM]	χ [mS cm ⁻¹]
L10	10	8,75	2,6
L100	100	87,5	19,9
L250	250	218,75	41,7
L500	500	437,5	68,6
L750	750	656,25	86,8
L1000	1000	875	98,5

Als Analytlösung werden jeweils 0,5 μL einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) in Puffer C (Zusammensetzung: $c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ mM}$) aufgetragen. Abbildung 117 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe für jede untersuchte Leitfähigkeit.

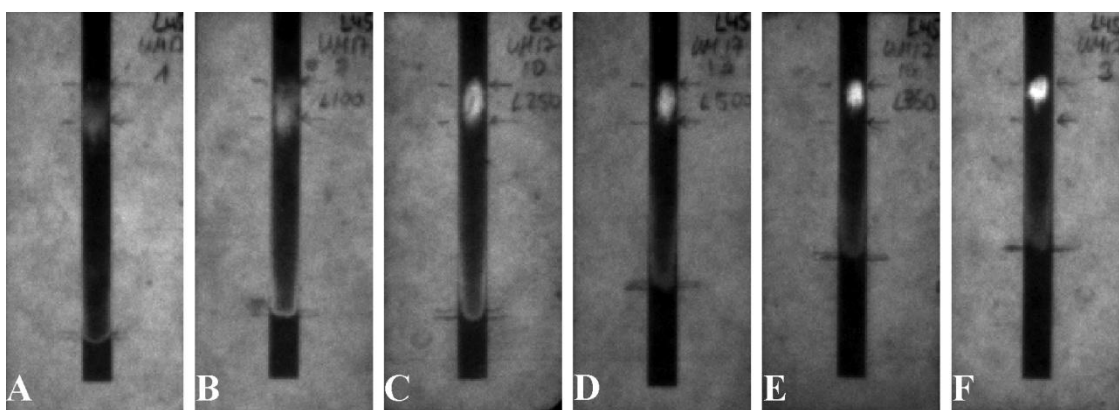


Abbildung 117: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der Retentionsexperimente für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) in Puffer C verschiedener Leitfähigkeiten (2,6; 19,9; 41,7; 68,6; 86,8; 98,5 mS cm⁻¹) als Laufmittel (von links nach rechts).^[133]

Für jede Leitfähigkeit wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegten Strecken d_{Fluid} sind in Abbildung 118 aufgetragen. Es wird eine schwache Erniedrigung der zurückgelegten Strecke mit zunehmender Leitfähigkeit beobachtet.

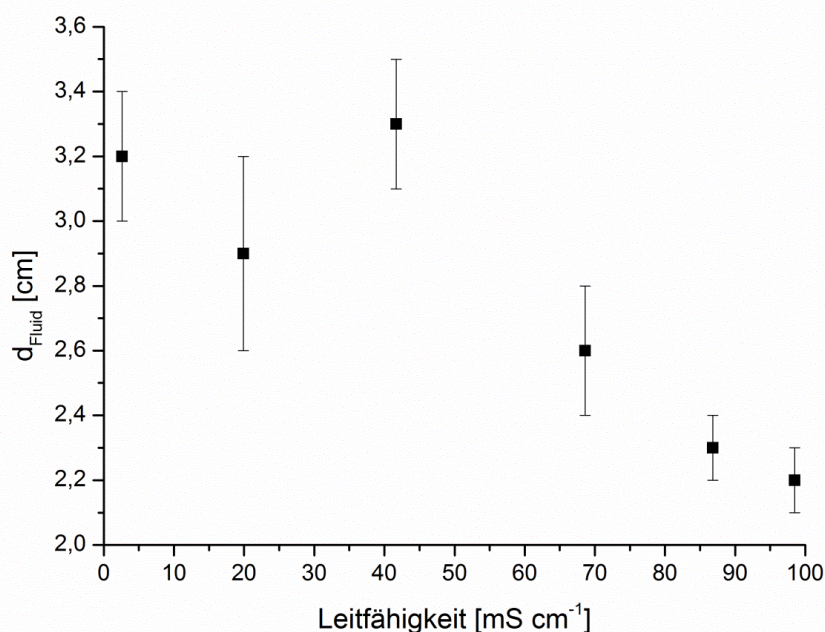


Abbildung 118: Während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegte Strecke d_{Fluid} als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: Puffer C verschiedener Leitfähigkeiten (2,6; 19,9; 41,7; 68,6; 86,8; 98,5 mS cm^{-1}). Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

In Abbildung 119 ist der Retentionsfaktor in Abhängigkeit der Leitfähigkeit aufgetragen (Auswertung nach Abschnitt 3.3.1).

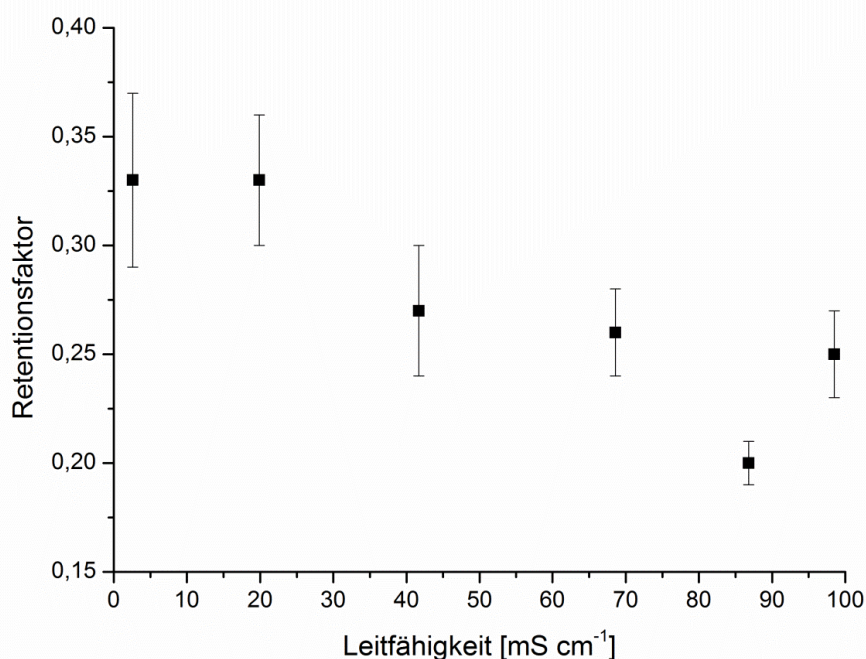


Abbildung 119: Retentionsfaktor als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: Puffer C (pH = 7,4) verschiedener Leitfähigkeiten (2,6; 19,9; 41,7; 68,6; 86,8; 98,5 mS cm^{-1}). Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

Der Retentionsfaktor nahm in den Experimenten mit zunehmender Leitfähigkeit leicht ab. Verschiedene Erklärungsansätze für das beobachtete Verhalten konnten gefunden werden. Eine Möglichkeit wäre, dass bei der beobachteten Wechselwirkung nicht der deutlich größere positive Bereich der Proteinoberfläche, sondern der deutlich kleiner negativ geladene Proteinbereich entscheidend ist. In diesem Fall wären die wechselwirkenden Ladungen gleichnamig und würden, wie beobachtet, eine Abnahme des Retentionsfaktors mit zunehmender Leitfähigkeit erwarten lassen. Dieser Ansatz passt allerdings nur bedingt zu den Beobachtungen zur pH-wertabhängigen Retention von IL-8-TAMRA (Abschnitt 7.2.1). Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass sich in der mit zunehmender Leitfähigkeit leicht zunehmenden Retention ein Einfluss der Laufweite widerspiegelt. Wie Abbildung 115 (Abschnitt 9.8.1) zeigt, nahm die vom Fluid in 12 min zurückgelegte Strecke mit zunehmender Leitfähigkeit leicht ab. Folglich hatte ein Analyt mehr Zeit mit dem Cellulosefasernetzwerk zu interagieren, was die Wechselwirkung und auch die Retention erhöhen könnte. Problematisch ist allerdings, dass dieser Erklärungsansatz im Widerspruch zu den in Abschnitt 5.2.2 bzw. Abschnitt 9.6.3 beschriebenen Untersuchungen steht.

Diese kontroversen Erklärungsansätze machen deutlich, dass das Verhalten nicht trivial zu erklären ist und umfassende Untersuchungen nötig sind, die für zukünftige Arbeiten angedacht wurden.

In Abbildung 120 ist die Bandenverbreiterung des Proteinspots in Abhängigkeit der Leitfähigkeit des Laufmittels aufgetragen. Es war kein Einfluss des untersuchten Parameters Leitfähigkeit zu erkennen.

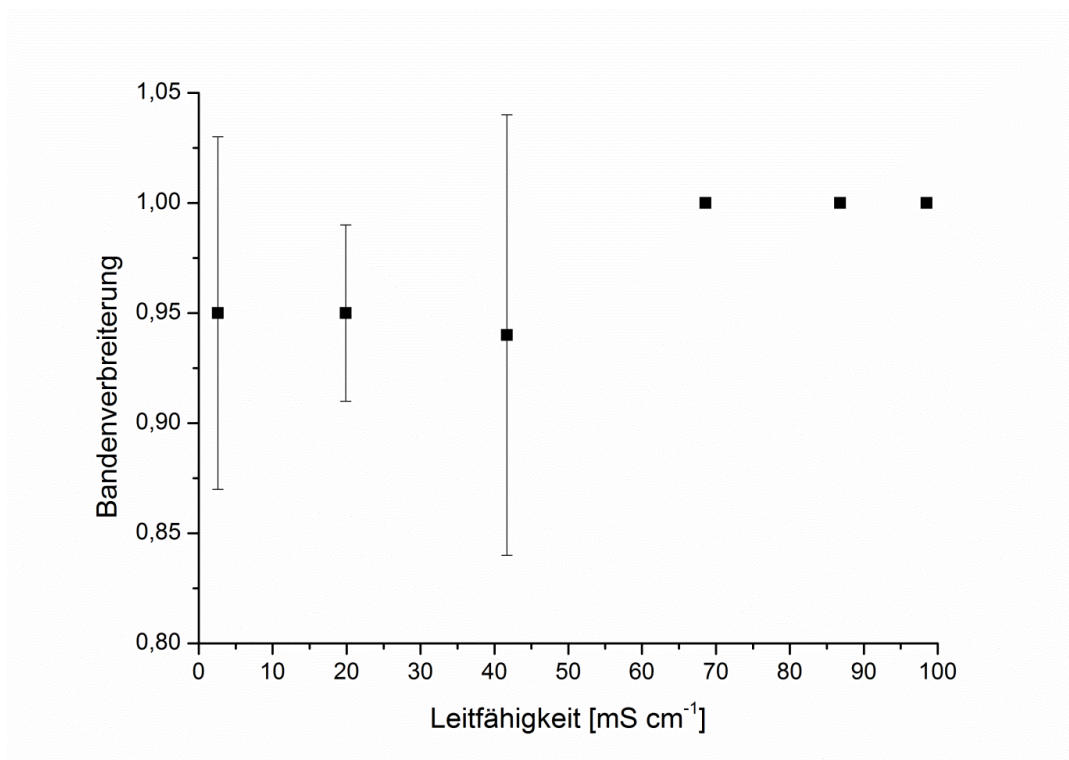


Abbildung 120: Bandenverbreiterung als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: Puffer C verschiedener Leitfähigkeiten (2,6; 19,9; 41,7; 68,6; 86,8; 98,5 mS cm^{-1}). Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

9.8.4. Einfluss der Pufferart

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Baumwollinterspapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Laufmittel werden vier verschiedene Pufferarten mit einheitlichen pH-Wert (pH 7,4) und einheitlichen Leitfähigkeiten ($\chi = 18,36 \pm 0,04 \text{ mS cm}^{-1}$) verwendet (Tabelle 30).

Tabelle 30: Zusammensetzung und Leitfähigkeiten der als Laufmittel verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Komponenten (Konzentration)	χ [mS cm ⁻¹]
Puffer C	Natriumdihydrogenphosphat (40 mM), Natriumchlorid (35 mM)	18,32
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (49,9 mM), Natriumchlorid (149,9 mM)	18,41
PBS	Dinatriumhydrogenphosphat (10,1 mM), Kaliumdihydrogenphosphat (1,7 mM), Natriumchlorid (136,9 mM), Kaliumchlorid (2,7 mM)	18,40
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (50,4 mM), Natriumchlorid (136,9 mM), Dinatriumhydrogenphosphat (1,9 mM)	18,35

Als Analytlösung werden jeweils $0,5 \mu\text{L}$ einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) in Puffer C (Zusammensetzung: $c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ mM}$) aufgetragen. Abbildung 121 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe für jede untersuchte Pufferart.

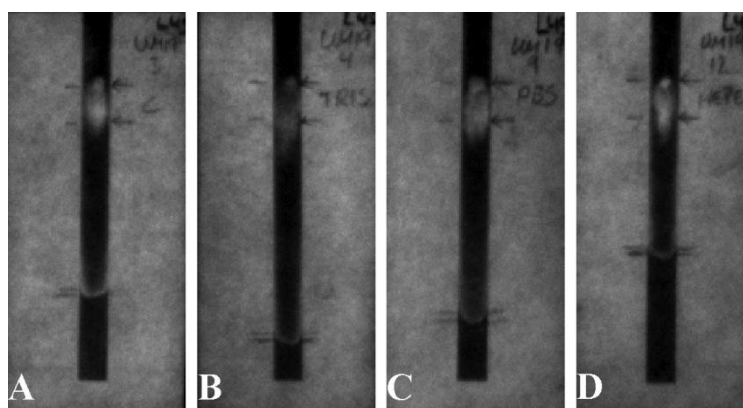


Abbildung 121: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der Retentionsexperimente für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) in Puffer C, Tris-Puffer, PBS-Puffer, HEPES-Puffer bei pH 7,4 und einer Leitfähigkeit von $18,36 \pm 0,04 \text{ mS cm}^{-1}$ als Laufmittel (von links nach rechts).^[133]

Für jede Pufferart wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten, während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegten Strecken d_{Fluid} , sind in Abbildung 122 aufgetragen. Wie in Abschnitt 7.2.2 bereits erklärt, verhält sich die zurückgelegte Strecke wie erwartet und bleibt im Rahmen des Fehlers konstant.

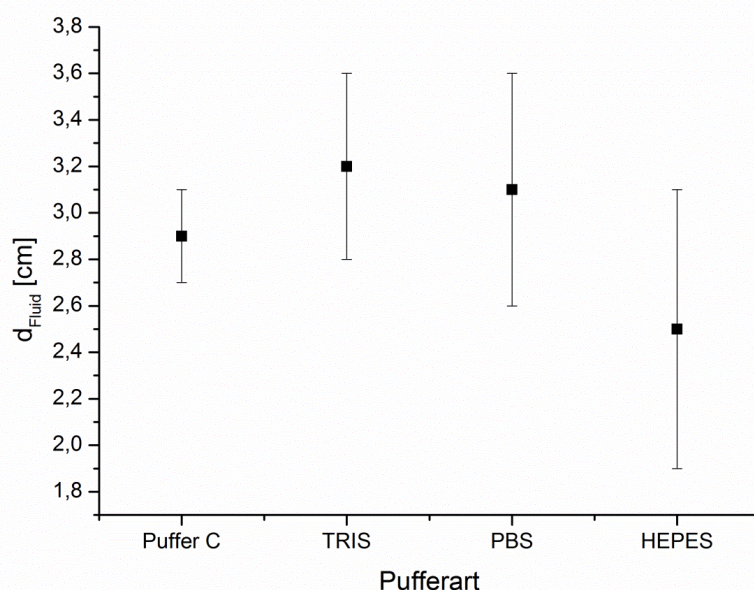


Abbildung 122: Während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegte Strecke d_{Fluid} als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: Puffer C, Tris-Puffer, PBS-Puffer, HEPES-Puffer bei pH 7,4 und einer Leitfähigkeit von $18,36 \pm 0,04 \text{ mS cm}^{-1}$. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

In Abbildung 123 ist die Bandenverbreiterung des Proteinspots in Abhängigkeit der Pufferart aufgetragen, die im Rahmen der Fehler nahezu konstant ist. Daher liefert sie keine weiteren Erkenntnisse zur Wechselwirkung von IL-8-TAMRA mit Papier.

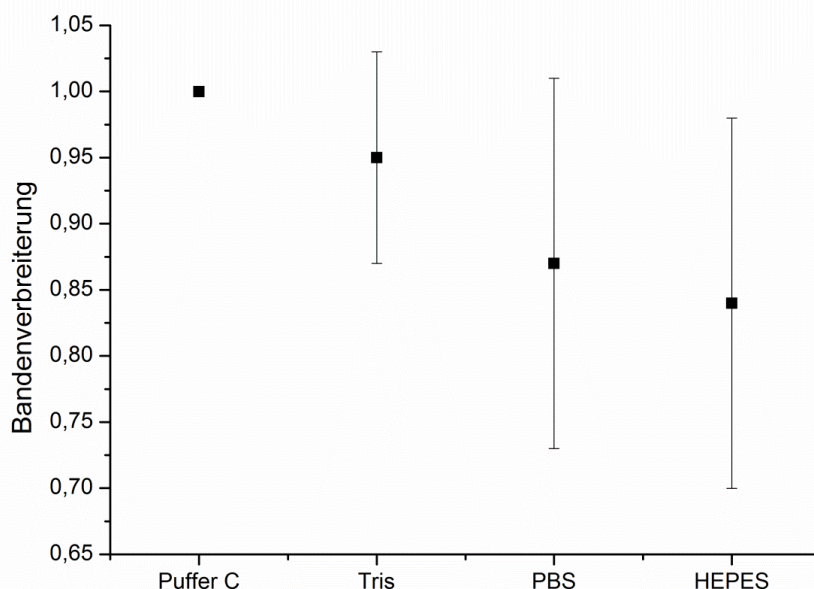


Abbildung 123: Bandenverbreiterung als Funktion der Leitfähigkeit für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C). Laufmittel: Puffer C, Tris-Puffer, PBS-Puffer, HEPES-Puffer bei pH 7,4 und einer Leitfähigkeit von $18,36 \pm 0,04 \text{ mS cm}^{-1}$. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

9.8.5. Einfluss der Analytkonzentration

Mikrostrukturierte Papiersubstrate werden mittels Photolithographie aus Baumwolllinterspapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Laufmittel wird Puffer C (Zusammensetzung: $c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ mM}$) bei einem mit Natronlauge eingestellten pH-Wert von 7,4 verwendet. Als Analytlösung werden jeweils $0,5 \mu\text{L}$ einer IL-8-TAMRA-Lösung im gleichen Puffer aufgetragen. Die Konzentration der IL-8-TAMRA-Lösung wird variiert ($c = 7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Abbildung 124 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe für die verschiedenen Analytkonzentrationen.

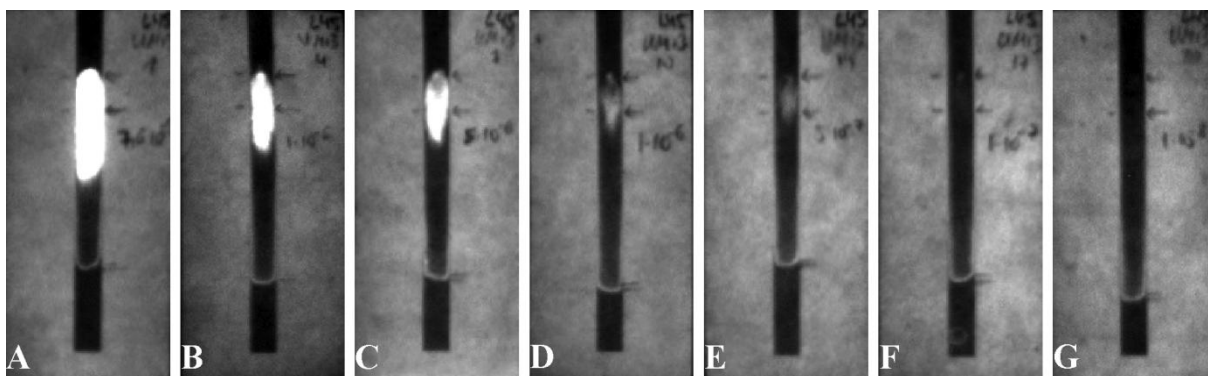


Abbildung 124: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der Retentionsexperimente für IL-8-TAMRA-Lösung verschiedener Konzentrationen ($7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) (von links nach rechts). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4.^[133]

Für jede Proteinkonzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die aus diesen drei Messungen gemittelten, während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegten Strecken d_{Fluid} sind in Abbildung 125 aufgetragen. Wie in Abschnitt 7.2.3 bereits erklärt, verhält sich die zurückgelegte Strecke wie erwartet und bleibt im Rahmen des Fehlers konstant.

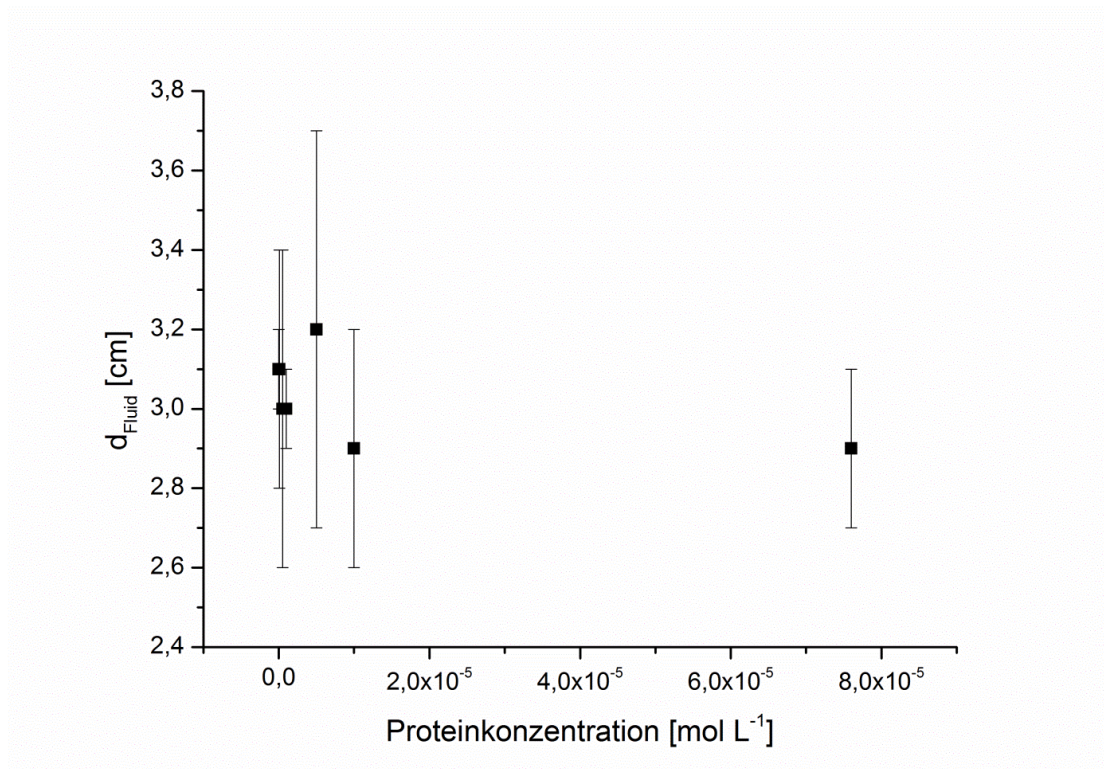


Abbildung 125: Während der Proteinmigration vom Fluid zurückgelegte Strecke d_{Fluid} als Funktion der Proteinkonzentration für applizierte IL-8-TAMRA-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwollinters.

In Abbildung 126 ist die Bandenverbreiterung des Proteinspots in Abhängigkeit der Proteinkonzentration der aufgetragenen Lösung aufgetragen. Diese ist im Rahmen der Fehler konstant maximal und liefert daher keine weiteren Erkenntnisse zur Wechselwirkung von IL-8-TAMRA mit Papier.

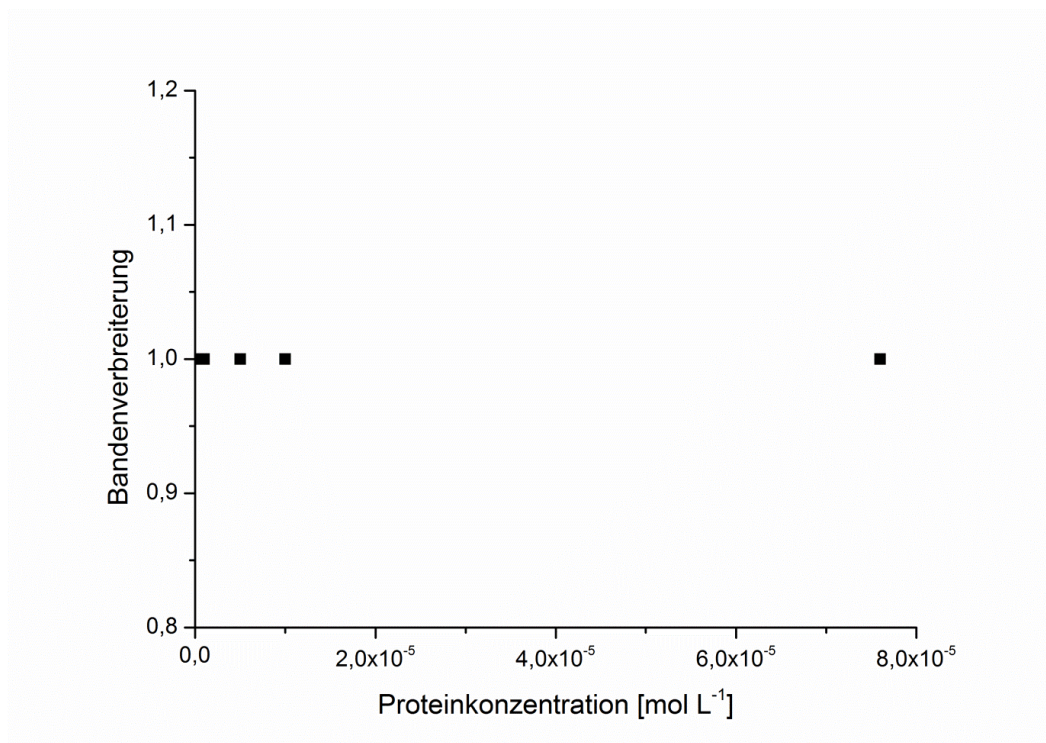


Abbildung 126: Bandenverbreiterung als Funktion der Proteinkonzentration für applizierte IL-8-TAMRA-Lösung verschiedener Konzentrationen ($7,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. Papiersubstrat: 45 g m^{-2} Baumwolllinters.

9.8.6. Untersuchungen zu lösungsmittelbasierten Fluiden

Die Retentionsexperimente mit lösungsmittelbasierten Fluiden werden im vertikalen System durchgeführt. Dazu werden mikrostrukturierte Papiersubstrate mittels der Methode des "Cuttings" aus Baumwolllinterspapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (UM3) hergestellt. Die Experimente werden wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Als Laufmittel werden neben Puffer C (Zusammensetzung: $c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ mM}$) als Referenz die vier in Abschnitt 7.2.4 beschriebenen lösungsmittelbasierten Fluide untersucht. Als Analytlösung werden jeweils $0,5 \mu\text{L}$ einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) aufgetragen. Für jedes Fluid wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Abbildung 127 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe für jedes untersuchte Fluid.

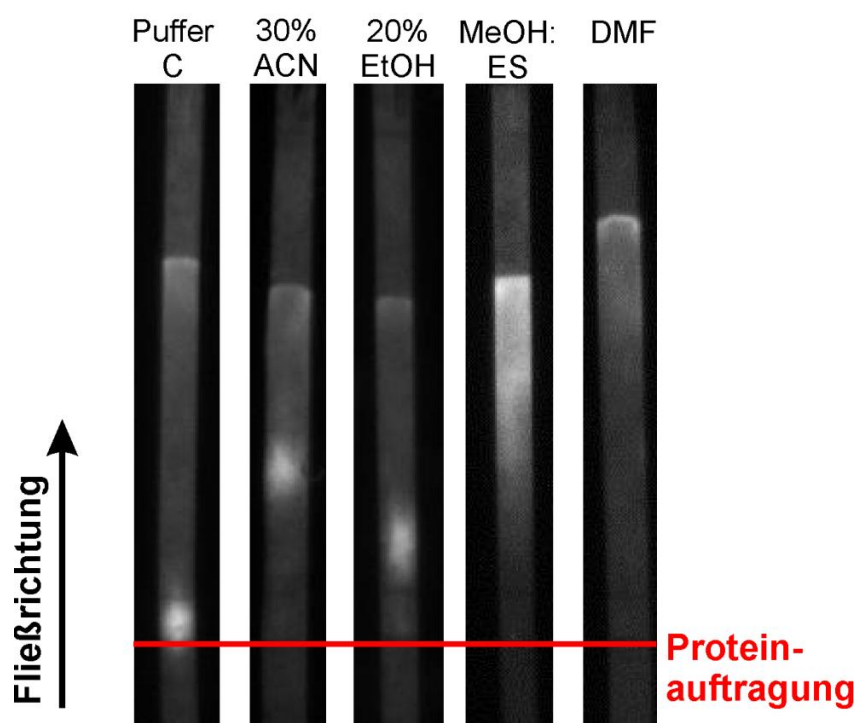


Abbildung 127: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der Retentionsexperimente für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) im vertikalen System mit verschiedenen Laufmitteln.

Da es sich bei den Untersuchungen lediglich um erste Testläufe in einem neu entwickelten System handelt, erfolgt die Auswertung qualitativ, wie in Abschnitt 3.3.1 für Farbstoffe beschrieben.

9.8.7. Einfluss der Modifikation der Substratoberfläche mit P(DMAA-co-MABP)

Zur Probenvorbereitung werden zunächst mikrostrukturierte Papiersubstrate mittels Photolithographie aus Baumwollinterspapier des Flächengewichts 45 g m^{-2} (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Ausgenommen den Referenzen, werden diese im Folgenden mit Hilfe des aus Böhm *et al.*^[21] bekannten photolithographischen Verfahrens ortsspezifisch mit P(DMAA-co-MABP) modifiziert. Dafür wird P(DMAA-co-MABP) mit einer Konzentration von 30 mg mL^{-1} bzw. 60 mg mL^{-1} in Chloroform gelöst. Die im ersten Schritt bereits mikrostrukturierten Papiersubstrate werden mit jeweils einer dieser Lösungen tauchbeschichtet, sodass das photoreaktive Polymer auf dem gesamten Papiersubstrat physisorbiert. Durch selektive UV-Bestrahlung des Papiersubstrats durch eine Photomaske, die lediglich den bisher noch unbeschichteten, rechteckigen Bereich von $0,4 \times 5,0 \text{ cm}$ in der Substratmitte ausspart, wird das Polymer in diesem Bereich kovalent gebunden. Nach der Belichtung wird das Polymer in einer anschließenden Soxhlet-Extraktion mit Chloroform für 3 h aus den nicht bestrahlten Bereichen wieder entfernt. Die Papiersubstrate werden für mindestens 15 h unter Normklimabedingungen ($T = 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 50% relative Luftfeuchtigkeit) gelagert, bevor sie im anschließenden Experiment eingesetzt werden.

Das Experiment erfolgt wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Laufmittel werden Puffer C (Zusammensetzung: $c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ mM}$) verwendet. Als Analytlösung werden jeweils $0,5 \text{ } \mu\text{L}$ einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Puffer C) aufgetragen. Es wird eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Abbildung 128 zeigt beispielhaft jeweils eine Probe der unbeschichteten Referenz sowie der mit verschiedenen Konzentrationen beschichteten Proben.

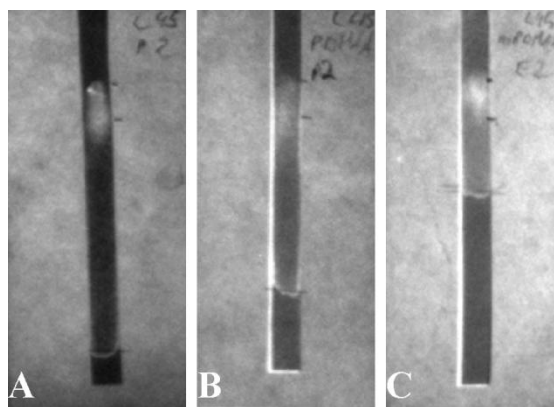


Abbildung 128: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der Retentionsexperimente für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. (A) Unbeschichteter Kanal. (B) Kanal beschichtet mit P(DMAA-co-MABP)-Lösung einer Konzentration von 30 mg mL^{-1} . (C) Kanal beschichtet mit P(DMAA-co-MABP)-Lösung einer Konzentration von 60 mg mL^{-1} .

9.8.8. Einfluss der Modifikation der Substratoberfläche mit Rinderserumalbumin (BSA)

Zur Probenvorbereitung werden zunächst mikrostrukturierte Papiersubstrate mittels Photolithographie aus Baumwollinterspapier des Flächengewichts 45 g m^{-1} (UM3) hergestellt (Abschnitt 9.5.1). Die BSA-Modifikation des Papiersubstrats erfolgt in Anlehnung an die bei Wong *et al.*^[5] und Jeyachandran *et al.*^[173] beschriebene Blockierung. Ausgenommen den Referenzen, werden diese in einer BSA-Lösung (3 wt-%) bei Raumtemperatur und 160 rpm für 30 min geschüttelt. Physisorbiertes BSA haftet auch nach einer Spülung mit Puffer C im Cellulosefasernetzwerk und soll dort mögliche Proteinadsorptionsplätze blockieren. Die modifizierten Papiersubstrate werden für mindestens 15 h unter Normklimabedingungen ($T = 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 % relative Luftfeuchtigkeit) gelagert, bevor sie im anschließenden Experiment eingesetzt werden.

Experiment und Auswertung erfolgen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Als Laufmittel wird Puffer C (Zusammensetzung: $c_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ mM}$) verwendet. Als Analytlösung wird jeweils $0,5 \text{ } \mu\text{L}$ einer IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) in Puffer C aufgetragen. Die Laufzeit beträgt nur 8 min statt der üblichen 12 min (vgl. Abschnitt 7.3.2). Es wird eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Abbildung 129 zeigt beispielhaft jeweils eine Aufnahme der unbeschichteten Referenz sowie der mit BSA beschichteten Proben.

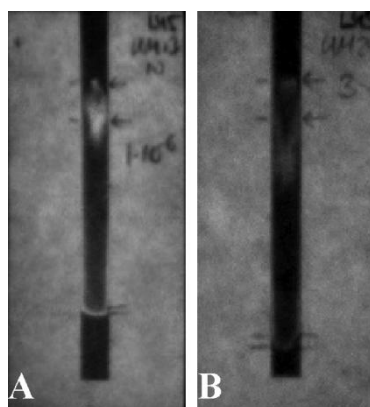


Abbildung 129: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der Retentionsexperimente für IL-8-TAMRA-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Laufmittel: Puffer C mit pH 7,4. (A) Unbeschichteter Kanal. (B) Kanal beschichtet mit BSA-Lösung einer Konzentration von 3 wt-%.^[133]

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AEMAC	(2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid
AIBN	2,2-Azobis(2-methylpropionitril)
AKD	Alkylierte Ketendimere
ÄP	Äquivalenzpunkt
APL	Alkalischer Phosphatase
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
Ca	Kapillarzahl
CD	Circulardichroismus
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DEE	Diethylether
deion.	deionisiert
DMAA	Polydimethylacrylamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleic acid
E	Eukalyptussulfat
ELISA	<i>Enzym-Linked Immunosorbent Assays</i>
ES	Essigsäure
EtOH	Ethanol
FDA	<i>Food and Drug Association</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSP	Faserfeuchtigkeitssättigungspunkt g g ⁻¹
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GOx	Glucoseoxidase
HÄP	Halbäquivalenzpunkt
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IEP	Isoelektrischer Punkt
IL-8	Interleukin-8
L	Baumwolllinters
Lc (I)	Nach Länge gewichtete mittlere Faserlänge
m	Multipllett
MABP	4-Methacryloyloxybenzophenon
MAC ₂ AE	N-Methacryloyl-β-alanin
MeOH	Methanol
MF	Melamin-Formaldehydharz
MSQ	Methylsilsesquioxan
NBT	Nitroblautetrazolium
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PAA	Polyacrylsäure
PAE	Polyamin-Epichlorhydrinharz
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
POC	<i>Point of Care</i>

POx	Peroxidase
PTS	Papiertechnischen Stiftung
PU	Polymeranalogue Umsetzung
PyMA	Pyrenemethylmethacrylat
R	Roth 15 A Filterpapier
RP-HPLC	<i>Reversed phase high pressure liquid chromatography</i>
S	Styrol
S ₀	Singulett-Grundzustand
S ₁	Singulettzustände
SARS	Schweres akutes respiratorisches Syndrom
SFT	Sekundäre Fluidtransportsteuerungstechniken
SW	Sonja Wendenburg
t	Triplett
T ₁ , T ₂	Triplett-Zustand
TAMRA	5(6)-Carboxytetrametylrhodamin
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-basierter Puffer
TU	Technische Universität
UF	Harnstoff-Formaldehydharz
UV	Ultraviolettes Licht
VE	Vollentsalzt
VEBP	Phenyl-(4-(2-vinyloxy)ethoxy)phenyl)methanon
VIS	Sichtbares Licht
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie
μPAD	<i>Microfluidic Paper-based Analytical Device</i>

Formelzeichen

A	Flächengewicht	g m ⁻²
a, b, c, x	Längenabmessungen	cm
B _v	Bandenverbreiterung	–
c	Konzentration, Normalität	mg mL ⁻¹
d	Mittlerer Porendurchmesser	μm, nm
Đ	Polydispersität	–
d _{Fluid}	Laufstrecke des Fluids	cm
d _{max}	Maximaler Laufstrecke	cm
d _{min}	Minimale Laufstrecke	cm
M _n	Zahlenmittleres Molekulargewicht	g mol ⁻¹
P	Porosität	%
q	Ladungsmenge	μeq g ⁻¹
q ₀	Verdampfungsrate	J kg ⁻¹
r	Mittlerer Porenradius	μm, nm
R _f	Retentionsfaktor	–
s	Papierdicke	μm
T	Temperatur	°C
U	Strömungspotential	mV
u	Benetzungsgeschwindigkeit	
V	Mittlere Porenvolumen, Volumen Titrationsmittel	mL
V _m	Molares Volumen eines Gases	m ³ mol ⁻¹
V _{Pore}	Porenvolumen	mm ³ g ⁻¹
w	Feststoffgehalt	g
x	zurückgelegte Strecke	cm

\bar{x}	Mittelwert	
x_i	Messwert	
γ	Oberflächenspannung	N m^{-1}
δ	Chemische Verschiebung	ppm
Δ	Fehler	
Δp	Druckdifferenz	bar
ξ	Zetapotential	mV
θ	Kontaktwinkel	°
κ	Ionenkonzentration	mS cm^{-1}
λ	Wellenlänge	nm; cm^{-1}
ρ	Papierdichte	kg m^{-3}
σ	Standardabweichung	
χ	Leitfähigkeit	mS cm^{-1}

Literaturverzeichnis

- [1] G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, 442, 368-373.
- [2] E. Berthier, E. W. K. Young, D. Beebe, *Lab on a chip* **2012**, 12, 1224-1237.
- [3] J. L. Osborn, B. Lutz, E. Fu, P. Kauffman, D. Y. Stevens, P. Yager, *Lab on a chip* **2010**, 10, 2659-2665.
- [4] A. K. Yetisen, M. S. Akram, C. R. Lowe, *Lab on a chip* **2013**, 13, 2210-2251.
- [5] R. C. Wong, H. Y. Tse, *Lateral Flow Immunoassay*, Humana Press, Springer Science and Business Media, New York, **2009**.
- [6] G. Garnier, W. L. Shen, *Paper Microfluidics: Applications and Perspectives*, Vol. 1, FRC - The Pulp & Paper Fundamental Research Society, Cambridge, **2013**.
- [7] M. M. Mansfield, Vol. 2017 (Ed.: O. D. E. Millipore), Merck Millipore Corporation, Bedford, MA, **2015**, pp. https://www.emdmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/-/Merck/en_US/Freestyle/DIV-Divisional/Events/pdfs/lateral-flow-presentations/design-considerations-for-lateral-flow-test-strips.pdf.
- [8] T. Lappalainen, T. Teerinen, P. Vento, L. Hakalahti, T. Erho, *Nordic Pulp & Paper* **2010**, 25, 529-543.
- [9] T. Teerinen, T. Lappalainen, T. Erho, *Anal Bioanal Chem* **2014**, 406, 5955-5965.
- [10] J. Blechschmidt, *Taschenbuch der Papiertechnik*, Carl Hanser Verlag, München, **2010**.
- [11] Y. Xia, J. Si, Z. Li, *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, 77, 774-789.
- [12] J. Credou, T. Berthelot, *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, 2, 4767-4788.
- [13] D. D. Liana, B. Raguse, J. J. Gooding, E. Chow, *Sensors* **2012**, 12, 11505-11526.
- [14] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht, *Comprehensive Cellulose Chemistry*, Vol. 1, WILEY-VCH, Weinheim, **1998**.
- [15] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, 13-18-1320.
- [16] K. Yamanda, T. G. Henares, K. Suzuki, D. Citterio, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 5294-5310.
- [17] X. Li, D. R. Ballerini, W. Shen, *Biomicrofluidics* **2012**, 6, 1-13.
- [18] aW. L. Then, G. Garnier, *Rev Anal Chem* **2013**, 32, 269-294; bD. M. Cate, J. A. Adkins, J. Mettakoonpitak, C. S. Henry, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 19-41.
- [19] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, B. Lin, *Electrophoresis* **2009**, 30, 1497-1500.
- [20] E. Carrilho, A. W. Martinez, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7091-7095.
- [21] A. Böhm, M. Gattermayer, C. Trieb, S. Schabel, D. Fiedler, F. Miletzky, M. Biesalski, *Cellulose* **2013**, 20, 467-483.
- [22] X. Li, J. Tian, W. Shen, *Anal Bioanal Chem* **2009**, 396, 495-501.
- [23] A. Böhm, M. Gattermayer, F. Carstens, S. Schabel, M. Biesalski, *Designing microfabricated paper devices through tailored polymer attachment*, Vol. 2, FRC - The Pulp & Paper Fundamental Research Society, Cambridge, **2013**.
- [24] A. Böhm, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2014**.
- [25] D. Freidank, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau (Freiburg im Breisgau), **2005**.
- [26] A. Böhm, F. Carstens, C. Trieb, S. Schabel, M. Biesalski, *Microfluid Nanofluid* **2014**, 16, 789-799.
- [27] S. Bump, A. Böhm, L. Babel, S. Wendenburg, F. Carstens, S. Schabel, M. Biesalski, T. Meckel, *Cellulose* **2015**, 22, 73-88.
- [28] J. Wang, M. R. N. Monton, X. Zhang, C. D. M. Filipe, R. Pelton, J. D. Brennan, *Lab on a chip* **2014**, 14, 691-695.
- [29] aA. C. Glavan, R. V. Martinez, E. J. Maxwell, A. B. Subramaniam, R. M. D. Nunes, S. Soh, G. M. Whitesides, *Lab on a chip* **2013**, 13, 2922-2930; bA. C. Glavan, R. V. Martinez, A. B. Subramaniam, H. J. Yoon, R. M. D. Nunes, H. Lange, M. M. Thuo, G. M. Whitesides, *Advanced Functional Materials* **2014**, 24, 60-70.

- [30] E. M. Fenton, M. R. Mascarenas, G. P. López, S. S. Sibbett, *ACS Applied Materials and Interfaces* **2009**, *1*, 124-129.
- [31] J. Nie, Y. Liang, Y. Zhang, S. Le, D. Li, S. Zhang, *Analyst* **2013**, *138*, 671-676.
- [32] J. P. Rolland, D. A. Mourey, *MRS Bulletin* **2013**, *38*, 299-305.
- [33] A. Böhm, M. Biesalski, *MRS Bulletin* **2017**, *42*, 356-364.
- [34] S. M. Z. Hossain, J. D. Brennan, *Anal Chem* **2011**, *83*, 8772-8778.
- [35] H. Liu, R. M. Crooks, *J. Amer. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17564-17566.
- [36] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, *105*, 19606-19611.
- [37] M. M. Gong, P. Zhang, B. D. MacDonald, D. Sinton, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8090-8097.
- [38] S. Jahanshahi-Anbuhi, P. Chavan, C. Sicard, V. Leung, S. M. Z. Hossain, R. Pelton, J. D. Brennan, *Lab on a chip* **2012**, *12*, 5079-5085.
- [39] E. Fu, S. A. Ramsey, P. Kauffman, B. Lutz, P. Yager, *Microfluid Nanofluid* **2011**, *10*, 29-35.
- [40] B. Lutz, T. Liang, E. Fu, S. Ramachandran, P. Kauffman, P. Yager, *Lab on a chip* **2013**, *13*, 2840-2847.
- [41] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, W. Shen, *Anal Chem* **2008**, *80*, 9131-9134.
- [42] aB. R. Lutz, P. Trinh, C. Ball, E. Fu, P. Yager, *Lab on a chip* **2011**, *11*, 4274-4278; bE. Fu, B. Lutz, P. Kauffman, P. Yager, *Lab on a chip* **2010**, *10*, 918-920.
- [43] J. Houghtaling, T. Liang, G. Thiessen, E. Fu, *Anal Chem* **2013**, *85*, 11201-11204.
- [44] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, W. Laiwattanapaisal, *Lab on a chip* **2012**, *12*, 3392-3398.
- [45] X. Yang, O. Forouzan, T. P. Brown, S. S. Shevkoplyas, *Lab on a chip* **2012**, *12*, 274-280.
- [46] aM. Al-Tamimi, W. Shen, R. Zeineddine, H. Tran, G. Garnier, *Anal Chem* **2012**, *84*, 1661-1668; bP. Jarujamrus, J. Tian, X. Li, A. Siripinyanond, J. Shiowatana, W. Shen, *Analyst* **2012**, *137*, 2205-2210.
- [47] C.-M. Cheng, A. W. Martinez, J. Gong, C. R. Mace, S. T. Phillips, E. Carrilho, K. A. Mirica, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4771-4774.
- [48] S. T. Phillips, G. G. Lewis, *MRS Bulletin* **2013**, *38*, 315-319.
- [49] H. Noh, S. T. Phillips, *Anal Chem* **2010**, *82*, 4181-4187.
- [50] G. Association, London, **2011**.
- [51] R. F. Zuk, V. K. Ginsberg, T. Houts, J. Rabble, H. Merrick, E. F. Ullman, M. M. Fischer, C. C. Sizto, D. J. Litman, *Clin Chem* **1985**, *31*, 1144-1150.
- [52] D. M. Cate, W. Dungchai, J. C. Cunningham, J. Volckens, C. S. Henry, *Lab on a chip* **2013**, *13*, 2397-2404.
- [53] G. G. Lewis, M. J. DiTucci, S. T. Phillips, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12707-12710.
- [54] aN. K. Thom, G. G. Lewis, K. Yeung, S. T. Phillips, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1334-1340; bD. A. Bruzewicz, M. Reches, G. M. Whitesides, *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, *80*, 3387-3392; cK. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal Chem* **2008**, *80*, 6928-6934; dW. Wang, W. Y. Wu, W. Wang, J. J. Zhu, *J Chromatogr A* **2010**, *1217*, 3896-3899; eH. Liu, X. Li, R. M. Crooks, *Anal Chem* **2013**, *85*, 4263-4267; fD. Sechi, B. Greer, J. Johnson, N. Hashemi, *Anal chem* **2013**, *85*, 10733-10737.
- [55] aX. Li, J. F. Tian, W. Shen, *Cellulose* **2010**, *17*, 649-659; bW. Dungchain, O. Chailapakul, C. S. Henry, *Anal Chem* **2009**, *81*, 5821-5826; cJ. H. Yu, J. D. Huang, S. M. Wang, S. G. Ge, *Lab on a chip* **2011**, *11*, 1286-1291; dR. F. Carvalhal, M. S. Kfoury, M. H. Piazzetta, A. L. Gobbi, L. T. Kubota, *Anal Chem* **2010**, *82*, 1162-1165; eX. Li, X. Liu, *Microfluid Nanofluid* **2014**, *16*, 819-827.
- [56] aP. Rattanarat, W. Dungchai, D. M. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul, C. S. Henry, *Anal Chem* **2014**, *86*, 3555-3562; bW. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, *The Analyst* **2011**, *136*, 77-82; cZ. H. Nie, C. A. Nijhuis, J. L. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A. W. Martinez, M. Narovlyansky, G. M. Whitesides, *Lab on a chip* **2010**, *10*, 477-483; dA. Apilux, W. Siangproh, N. Praphairaksit, O. Chailapakul, *Talanta* **2012**, *97*, 388-394; eM. Zhang, L. Ge, S. Ge, M. Yan, J. Yu, J. Huang, S. Liu, *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *41*, 544-550.

- [57] aS. M. Z. Hossain, R. E. Luckham, M. J. McFadden, J. D. Brennan, *Anal Chem* **2009**, *81*, 9055-9064; bR. E. Luckham, J. D. Brennan, *The Analyst* **2010**, *135*, 2028-2035; cW. Liu, J. Kou, H. Xing, B. Li, *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *52*, 76-81.
- [58] M. L. Smith, Vol. 2017, Diagnostics for all, <http://dfa.org/liver-function/>, **2015**.
- [59] H. Kettler, K. White, S. Hawkes, (Ed.: W. H. Organisation), UNICEF/UNDP/World Bank/WHO, **2004**.
- [60] P. Gong, D. W. Graininger, *Nonfouling Surfaces, Vol. Volume 1 - Synthesis Methods*, Humana Press. Inc, Totowa, New Jersey, **2007**.
- [61] N. Fischer, (Ed.: S. Wendenburg), **2015**.
- [62] S. K. Mahadeva, K. Walus, B. Stoeber, *ACS Applied Materials and Interfaces* **2015**, *7*, 8345-8362.
- [63] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3422-3458.
- [64] M. N. Costa, B. Veigas, J. M. Jacob, D. S. Santos, J. Gomes, P. V. Baptista, R. Martins, J. Inacio, E. Fortunato, *Nanotechnology* **2014**, *25*.
- [65] M. d. Papel, Vol. 2017, **2017**, p. <http://daflorestaapapel.com/p5/>
- [66] H. A. Krässig, *Cellulose Structure, Accessibility and Reactivity*, Gordon and Beach Science Publishers, Yverdon, Switzerland, **1993**.
- [67] D. Roy, M. Semsarilar, J. T. Guthrie, S. Perrier, *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 2046-2064.
- [68] K. Niskanen, J. Gullichsen, H. Paulapuro, 16. *Paper Physics*, Vol. 16, Finnish Paper Engineer's Association, Helsinki, **1998**.
- [69] M. W. Ott, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2017**.
- [70] T. P. Nevell, S. H. Zeronian, *Cellulose Chemistry and its Applications*, Ellis Horwood limited, Chichester, West Sussex, England, **1985**.
- [71] A. Pande, *Laboratory Practice* **1967**, *16*, 714-718.
- [72] J. Gullichsen, H. Paulapuro, *Chemical Pulping*, Vol. 6A, Papermaking Science and Technology, Helsinki, **1998**.
- [73] K. Niskanen, P. Pakarinen, *Paper Physics*, Vol. 16, 2 ed., Finnish Paper Engineers' Association/Paperi ja Puu Oy, **2009**.
- [74] aE. Gruber, Vol. 2017, **2011**, p. http://www.gruberscript.net/21Zellstoffanalyse_physikalisch.pdf; bN. K. Bhardwaj, V. Hong, K. L. Nguyen, *Bioresource Technology* **2007**, *98*, 1647-1654.
- [75] J. Garcia, E. M. Cardena, T. Vidal, A. L. Torres, V CONGRESO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION EN CELULOSA Y PAPEL **2008**.
- [76] E. Ott, H. M. Spurlin, M. W. Grafflin, *Cellulose and Cellulose Derivatives*, Vol. 2, Interscience Publishers, Inc, New York, **1954**.
- [77] H. Temming, H. Grunert, 2 ed., Peter Temming AG, Glückstadt, **1972**.
- [78] T. M. Herrington, B. R. Midmore, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1984**, *80*, 1553-1566.
- [79] VDP, Bonn, **2015**.
- [80] B. Focher, *Materials Engineering* **1997**, *8*, 201-226.
- [81] K. Blus, J. Czechowski, A. Koziróg, *Fibres and textiles in Eastern Europe* **2014**, *22*, 121-125.
- [82] K. Hunger, *Industrial Dyes - Chemistry, Properties, Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2003**.
- [83] L. Neimo, *Papermaking Chemistry*, Vol. 4, Finish Paper Engineers' Association/Paperi ja Puu Oy, **2009**.
- [84] H. Holik, *Handbook of Paper and Board*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, **2006**.
- [85] E. J. Siqueira, Université de Grenoble (Grenoble), **2012**.
- [86] S. Su, M. M. Ali, C. D. M. Filipe, Y. Li, R. Pelton, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 935-941.
- [87] Z. Huang, T. Gengenbach, J. Tian, W. Shen, G. Garnier, *Colloids and Surface B: Biointerfaces* **2017**, *158*, 197-202.
- [88] H. Modaressi, G. Garnier, *Langmuir* **2002**, *18*, 642-649.
- [89] M. M. Gong, D. Sinton, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8447-8480.

- [90] R. Masoodi, K. M. Pillai, *Wicking in Porous Materials - Traditional and Modern Modeling Approaches*, CRC Press by Taylor & Francis Group, LLC, Padstow, Cornwall, Great Britain, **2013**.
- [91] C. K. Camplisson, K. M. Schilling, W. L. Pedrotti, H. A. Stone, A. W. Martinez, *Lab on a chip* **2015**, *15*, 4461-4466.
- [92] D. Palit, S. P. Moulik, *Indian Journal of Chemistry* **2000**, *39A*, 611-617.
- [93] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2006**.
- [94] J. Böcker, *Chromatographie - Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese*, Vogel Buchverlag, Würzburg, **1997**.
- [95] F. Cramer, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie GmbH, Darmstadt, **1958**.
- [96] G. Schwedt, C. Vogt, *Analytische Trennmethode*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- [97] J.-M. Liu, C.-C. Liu, G.-Z. Fang, S. Wang, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 58713-58726.
- [98] J. Weiß, *Ionenchromatographie*, VCH, Weinheim, **1991**.
- [99] aJ. M. T. Berg, J. L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, **2010**; bF. Lottspeich, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, **1998**.
- [100] R. W. Sabnis, *Handbook of Biological Dyes and Stanins - Synthesis and Industrial Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, **2010**.
- [101] G. L. Dotto, M. L. G. Vieira, L. A. A. Pinto, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51*, 6862-6868.
- [102] M. Gomez, V. Arancibia, C. Rojas, E. Nagles, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 7493-7502.
- [103] J. Hartmann-Schreier, in *Römpf*, Vol. 2017, Georg Thieme Verlag KG, <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-20-00247>, **2017**.
- [104] aS. Banerjee, M. C. Chattopadhyaya, *Arabian Journal of Chemistry* **2013**; bR. Shiralipour, A. Larki, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2017**, *135*, 123-129.
- [105] J. Bird, N. Brough, S. Dixon, S. N. Batchelor, *J. Phys. chem. B* **2006**, *110*, 19557-19561.
- [106] J. de Souza Macedo, N. B. Da Costa Junior, L. E. Almeida, E. F. da Silva Vieira, A. R. Cestari, I. de Fatima Gimenez, N. L. V. Carreno, L. S. Barreto, *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *298*, 515-522.
- [107] A. Baader, in *GESTIS-Stoffdatenbank*, Vol. 2017, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/100299.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/100299.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0), **2017**.
- [108] M. Wainwright, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2*, 263-272.
- [109] P. Ehrlich, *Zeitschrift für klinische Medizin* **1881**, *2*, 710-713.
- [110] P. Ehrlich, P. Guttman, *Berliner klinische Wochenschrift* **1891**, *28*, 953-956.
- [111] O. Impert, A. Katafias, P. Kita, A. Mills, A. Pietkiewicz-Graczyk, G. Wrzeszcz, *Dalton Trans* **2003**, 348-353.
- [112] R. Batmaz, N. Mohammed, M. Zaman, G. Minhas, R. M. Berry, K. C. Tam, *Cellulose* **2014**, *21*, 1655-1665.
- [113] C. Kaewprasit, E. Hequet, N. Abidi, J. P. Gourelot, *Journal of Cotton Science* **1998**, *2*, 164-173.
- [114] aM. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, *162*, 87-106; bE. A. Vogler, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1201-1237; cK. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2001**, *91*, 233-244; dA. K. Bajpai, R. Dengre, *Indian Journal of Chemistry* **1999**, *38A*, 101-112.
- [115] W. Norde, *Macromol. Symp.* **1996**, *103*, 5-18.
- [116] M. S. Khan, S. B. M. Hanniffa, A. Slater, G. Garnier, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *79*, 88-96.
- [117] aS. Petersen, M. Biesalski, *Int J Artif Organs* **2011**, *34*, 210-214; bM. Moschallski, A. Evers, T. Brandstetter, J. Rühle, *Analytica Chimica Acta* **2013**, *781*, 72-79.
- [118] aB. Moser, M. Wolf, A. Walz, P. Loetscher, *Trends in Immunology* **2004**, *25*, 75-84; bI. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz, *The Journal of Immunology* **2015**, *194*, 5594-5558.
- [119] I. Rink, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2016**.
- [120] M. Baggiolini, *Journal of Internal Medicine* **2001**, *250*, 91-104.

- [121] G. M. Clore, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1990**, 29, 1689-1696.
- [122] M. Baggiolini, I. Clark-Lewis, *Federation of European Biochemical Societies* **1992**, 307, 97-101.
- [123] D. J. Hei, A. T. T. ElKalay, B. Lin, T. B. Kshirsagar, T. B. Okarma, H. W. Blanch, *Biotechnology and Bioengineering* **1994**, 44, 1023-1030.
- [124] Z. Johnson, A. E. Proudfoot, T. M. Handel, *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2005**, 16, 625-636.
- [125] M. Baggiolini, A. Walz, S. L. Kunkel, *J. Clin. Invest.* **1989**, 84, 1045-1049.
- [126] E. T. Baldwin, I. T. Weber, R. S. Charles, J.-C. Xuan, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, B. F. P. Edwards, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Wlodawer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 502-506.
- [127] aC. S. C. Bouman, R. W. van Olden, C. P. Stoutenbeek, *Blood Purif* **1998**, 16, 261-268; bC. A. Howell, S. R. Sandeman, G. J. Phillips, A. W. Lloyd, J. G. Davies, S. V. Mikhalovsky, S. R. Tennison, A. P. Rawlinson, O. P. Kozynchenko, H. L. H. Owen, J. D. S. Gaylor, J. J. Rouse, J. M. Courtney, *Biomaterials* **2006**, 27, 5286-5291.
- [128] Y.-G. Lee, J. Jeong, J. Rafti, W.-S. Cho, *Journal of toxicology and environmental health Part A* **2016**, 78, 185-195.
- [129] S. Eckes, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2016**.
- [130] K. M. Schilling, A. L. Lepore, J. A. Kurian, A. W. Martinez, *Anal Chem* **2012**, 84, 1579-1585.
- [131] N. Walji, B. D. MacDonald, *Micromachines* **2016**, 7, 73-86.
- [132] S. Wendenburg, M.-L. Nachbar, M. Biesalski, *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, 218, 1600408-1600408.
- [133] U. B. Menges, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2016**.
- [134] S. Hong, W. Kim, *Microfluid Nanofluid* **2015**, 19, 845-853.
- [135] E. Gruber, (Ed.: D. H. Karlsruhe), **2011**.
- [136] V. Trouillet, S. Heißler, U. Geckle, E. Willin, W. Faubel, in *Wissenschaftliche Berichte FZKA 6468*, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, **2000**.
- [137] S. S. L. Sobhana, D. R. Bogati, M. Reza, J. Gustafsson, P. Fardim, *Microporous and Mesoporous Materials* **2016**, 225, 66-73.
- [138] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2002**.
- [139] N. K. Bhardwaj, K. L. Nguyen, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, 262, 232-237.
- [140] D. H. Ripin, D. A. Evans, Vol. 2017, http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans_pKa_table.pdf, **2005**, p. http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans_pKa_table.pdf.
- [141] L. Kaijanen, M. Paakkunainen, S. Pietarinen, E. Jernström, S.-P. Reinikainen, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2015**, 10, 2950-2961.
- [142] M. L. Stegmann, TU Darmstadt (Darmstadt), **2015**.
- [143] aA. Katafias, M. Lipinska, K. Strutynski, *Reac Kinet Mech Cat* **2010**, 101, 251-266; bC.-Y. Tzung, *Stain Technol.* **1964**, 39, 351-358; cG. N. Lewis, O. Goldschmidt, T. T. Magel, J. Bigeleisen, *J. Amer. Chem. Soc.* **1943**, 65, 1144-1150; dA. Mills, D. Hazafy, J. Parkinson, T. Tuttle, M. G. Hutchings, *Dyes and Pigments* **2011**, 88, 149-155.
- [144] R. W. Sabsin, *Handbook of Biological Dyes and Stains*, John Wiley & Sons, Inc., Madison, NJ, **2010**.
- [145] J. Songok, M. Toivakka, *Microfluid Nanofluid* **2016**, 20, 63.
- [146] D. Punal-Gamboa, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2014**.
- [147] J. M. Graf, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2016**.
- [148] M. Perez-Perrino, R. Navarro, O. Prucker, J. Rühe, *Macromolecules* **2014**, 47, 2695-2702.
- [149] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, Amsterdam, **2008**.

- [150] aR. Anbarasan, S. Kanchana, S. Gayathri, T. Jayalakshmi, V. Dhanalakshmi, *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *115*, 315-323; bK. Dan, P. Rajdev, J. Deb, S. S. Jana, S. Ghosh, *Journal of Polymer Science, Part A* **2013**, *51*, 4932-4943.
- [151] E. Pigorsch, *Starch* **2009**, *61*, 129-138.
- [152] M. Babic, D. Horak, P. Jendelova, K. Glogarova, V. Herynek, M. Trchova, K. Likavcanova, P. Lesny, E. Pollert, M. Hajek, E. Sykova, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 283-294.
- [153] Y. Cheng, C. Lü, Z. Lin, Y. Liu, C. Guan, H. Lü, B. Yang, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4062-4068.
- [154] X. Yang, B. Zhang, Z. Liu, B. Deng, M. Yu, L. Li, H. Jiang, J. Li, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 11908-11915.
- [155] G. Zhang, H. Zhang, X. Zhang, S. Zhu, L. Zhang, Q. Meng, M. Wang, Y. Li, B. Yang, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 21218-21224.
- [156] Müttek.
- [157] W. Göpel, C. Ziegler, *Struktur der Materie: Grundlagen, Mikroskopie und Spektroskopie*, B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, **1994**.
- [158] K. Artyushkova, S. Levendosky, P. Atanassov, J. Fulghum, *Top Catal* **2007**, *46*, 263-275.
- [159] M. Yang, R. L. M. Teeuwen, M. Giesbers, J. Baggerman, A. Arafat, F. A. de Wolf, J. C. M. van Hest, H. Zuilhof, *Langmuir* **2008**, *24*, 7931-7938.
- [160] D. Briggs, M. P. Seah, *Practical Surface Analysis, Vol. 1- Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **1990**.
- [161] G. C. Schäfer, M. Gallei, J. T. Zahn, J. Engelhardt, G. P. Hellmann, M. Rehahn, *Chemistry of Materials* **2013**, *25*, 2309-2318.
- [162] T. J. Dolinsky, P. Czodrowski, H. Li, J. E. Nielsen, J. H. Jensen, G. Klebe, N. A. Baker, *Nucleic Acid Res.* **2007**, *35*, W552-W525.
- [163] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10037-10041.
- [164] Jmol, **2016**.
- [165] M. V. Kvach, I. A. Stepanova, I. A. Prokhorenko, A. P. Stupak, D. A. Bolibrukh, V. A. Korshun, V. V. Shmanai, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1673-1682.
- [166] S. Aldrich, Vol. 2016, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/c2734?lang=de®ion=DE>, **2016**.
- [167] J. Inglese, P. Samama, S. Patel, J. Burbaum, I. L. Stroke, K. C. Appell, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2372-2377.
- [168] K. Brahm, Technische Universität Darmstadt **not yet published**.
- [169] aM. Schwarz, *Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus Pseudomonas fluorescens in Carboligasereaktionen mit aromatischen Aldehyden*, Vol. 35, Forschungszentrum Jülich GmbH Zentralbibliothek, Verlag, Jülich, **2011**; bB. Michov, *Elektrophorese Theorie und Praxis*, Walter de Gruyter & Co, Berlin, **1995**.
- [170] E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 113-129.
- [171] aS. Petersen, S. Loschonsky, O. Prucker, J. Rühe, M. Biesalski, *Phys. Status Solidi A* **2009**, *3*, 468-473; bS. Loschonsky, K. Shroff, A. Wörz, O. Prucker, J. Rühe, M. Biesalski, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 543-552.
- [172] P. Aliuos, A. Sen, U. Reich, W. Dempwolf, A. Warnecke, C. Hadler, T. Lenarz, H. Menzel, G. Reuter, *Journal of Biomedical Materials Research A* **2014**, *102A*, 117-127.
- [173] Y. L. Jeyachandran, E. Mielczarski, B. Rai, J. A. Mielczarski, *Langmuir* **2009**, *25*, 11614-11620.
- [174] Y. Xiao, S. N. Isaacs, *J Immunol Methods* **2012**, *384*, 148-151.
- [175] M. Taborrelli, L. Eng, P. Descouts, J. P. Ranieri, R. Bellamkonda, P. Aebischer, *J. Biomed. Mater. Res* **1995**, *29*, 707-714.
- [176] S. Di Risio, N. Yan, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *79*, 397-402.
- [177] B. Berchtold, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau (Freiburg im Breisgau), **2005**.
- [178] H. Murata, O. Prucker, J. Rühe, *Macromolecules* **2007**, *40*, 5497-5503.
- [179] M. A. Inc., *Bedienungshandbuch K 12690 V1.0 DE*, Finland, **2014**.

-
- [180] T. Burke, S. Renaud, in *TAPPI Spring Technical Conference & Trade Fair* (Ed.: B. Americas), **2003**.
- [181] M. T. Goulet, Lawrence University Appleton, Wisconsin (Atlanta), **1989**.
- [182] aR. Clasen, *Vol. 2017*, Universität des Saarlandes; Lehrstuhl für Pulvrtechnologie von Glas und Keramik, Saarbrücken, **2010**, pp. <http://www.uni-saarland.de/fak8/powdertech/lehre/handouts/Bachelorpraktikum/Quecksilber-Porosimetrie.pdf>; bH. Juntgen, M. Schwuger, *Chemie-Ing.-Techn.* **1966**, *12*, 1271-1278; cH. Giesche, *Part. Part. Syst. Charact.* **2006**, *23*, 1-11.
- [183] C. B. Bottom, S. S. Hanna, D. J. Siehr, *Biochem Educ* **1978**, *6*, 4-5.
- [184] S. M. Bleay, V. G. Sears, H. L. Bandey, A. P. Gibson, V. J. Bowman, R. Downham, L. Fitzgerald, T. Ciuksza, J. Ramadani, C. Selway, *Fingerprint Source Book*, Centre for Applied Science and Technology, <https://www.gov.uk/government/publications/fingerprint-source-book>, **2013**.

Summary and Outlook

Nitrocellulose-based dipstick and lateral flow rapid tests have been widely used since the middle of the previous century in areas such as clinical diagnostics, veterinary medicine, agriculture, food safety and environmental monitoring. Especially in underdeveloped regions, they provide a good alternative to laboratory analysis, increasing the health and quality of life of the residents.^[4-5] Nitrocellulose as a substrate for rapid tests is therefore a well-researched and well-established option.

Nevertheless, **paper as an alternative substrate material in lateral flow assays** is currently gaining more and more attention as it offers many advantages over nitrocellulose. It is inherently hydrophilic, flexible, less flammable, more temperature stable and less expensive than nitrocellulose (Chapter 1). Limitations of the sensitivity and specificity of the microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) currently still prevent a sufficient competitiveness of the substrate material paper over nitrocellulose in the market. However, this work showed how some of these limitations could be overcome through in-depth research. In this way, μ PADs could become a valuable tool for improving living conditions in developing countries.

To **overcome current limitations**, this work addressed the following key questions:

- Which paper types are suitable as substrate material? Which properties of paper could be particularly relevant for the retention of analytes in paper? Which methods can be used to characterize these properties?
- Which analytes are suitable as model molecules for initial retention studies in paper? Which analyte properties are particularly relevant for the interaction with paper and how can they be characterized?
- How can the retention of the model analytes in paper be investigated?
- Which parameters of the solid and fluid phases could influence the interaction of analyte and paper? How do these parameters affect the interaction? What can be deduced from these observations about the central influences and mechanisms of the interaction of the analytes with the substrate material?
- Which insights from the study of the interaction of model analytes and paper could be used in a targeted manner to control their retention? How could these findings be used to increase the sensitivity and specificity of the model system?
- To what extent can the acquired knowledge be transferred to complex analytes, such as proteins?

Hand-made papers made from cotton linters was investigated, as they appeared to be particularly suitable for use in μ PADs due to the high purity of cellulose. Furthermore, hand-made papers made from eucalyptus sulphate fibers was used as reference material for the use of wood pulp. Roth 15A filter paper was used as a comparison for the commercially available filter papers with wet strength agents often used in the literature. These **three types of paper** were comparatively tested for various parameters that might be relevant for the retention of the analytes (Chapter 4). In addition to the chemical composition of the fibers (elementary analysis in Section 4.1.1 and FTIR spectroscopy in Section 4.1.2), the characteristics of the fibers (Section 4.2), the **charge properties of the fibers** (Section 4.3) and **essential paper properties** (Section 4.4) were investigated. The results of the zeta potential measurements concerning the charge properties of the pulp as well as the thickness and mercury porosimetry measurements for characterization of the density and pore

size of the paper were particularly relevant for further experiments. Zeta potential measurements at different pH values showed for cotton linters and eucalyptus sulphate fibers a similar characteristic trend. The charge of the fibers was negative over the investigated pH range (pH 2-12). After a plateau between pH 5-11 at about pH 12 the charge decreased significantly, which was due to the deprotonation of the carboxyl respectively hydroxyl groups. Redispersed Roth 15A filter paper fibers were positively charged up to about pH 4, which was attributed to the presence of positively charged additives in the paper. They showed a continuous decrease in potential over the entire range until a significant jump was observed at pH 12. Investigations of paper densities revealed an exponential relationship between basis weight and density (Section 4.4.1) of the substrate material. The average pore radii of the papers used were in the range of 2-8 μm , depending on paper density (Section 4.4.2). A significant dependence of the pore radius on the paper density was observed. The paper type, however, had little influence on the pore radius.

As model analytes for initial retention studies in paper, the **negatively charged dye tartrazine and the positively charged dye methylene blue** were chosen. Since they are dyes, these analytes are easy to detect colorimetrically. Due to their different charge characteristics, which were investigated by charge titration and UV-VIS measurements as a function of pH (Section 5.1), they are ideal for evaluating the influence of electrostatic interactions on the retention of analytes in paper.

Based on known methods such as thin-layer chromatography or paper chromatography (Section 3.2.1), a procedure was developed with which the **retention factor** of the analytes in paper could be reproducibly determined as the main comparison parameter for assessing the retention (Section 3.3). In this case, a microstructured paper was contacted with an arbitrarily filled fluid reservoir. The fluid flowed through the microstructured channel, driven by capillary force. At a defined time, the analyte solution was applied with a microliter pipette. At the end of the experiment, the distance travelled by the fluid was set in relation to the distance travelled by the analyte, thus calculating the retention factor.

Fluids and solid phase can easily be varied in this setup. Therefore, this method was subsequently used to investigate the **interaction of the model analytes with the substrate material under varying parameters of the fluid and solid phases** (Chapter 5). Specifically, the influence of pH (Section 5.2.1), conductivity (Section 5.2.2) and analyte concentration of the fluid phase (Section 5.2.3) on the interaction of the dye molecules with the paper substrate was considered. In addition, the impact of the solid phase on paper density (Section 5.3.1) and paper type (Section 5.3.2) was examined. Examination of dye retention revealed marked differences in the retention of the positively charged methylene blue and the predominantly negatively charged tartrazine in the negatively charged microstructured paper substrates. Tartrazine had the lowest retention at high pH and conductivity. On the other hand, methylene blue retained significantly more strongly almost independently of these influencing parameters (Section 5.2.1 and 5.2.2). For both dyes, an increased analyte concentration led to an increased retention factor (Section 5.2.3). This was explained by an "overload" of the adsorption sites present in a channel section due to the high number of analyte molecules. The variation of paper density influenced retention of both model analytes only to a very limited extent (Section 5.3.1). The paper type affected the retention behaviour of the negatively charged tartrazine, but not that of the positively charged methylene blue (Section 5.3.2). These results, in combination, suggest that the adsorption chromatography model is well-suited for the interaction of dye molecules in paper. Analytes in the mobile phase

interact physically with cellulose fibers. Component-specific adsorption and desorption processes lead to different levels of retention. Electrostatic interactions between the charged substrate material and the charged analyte molecules must play a central role in this.

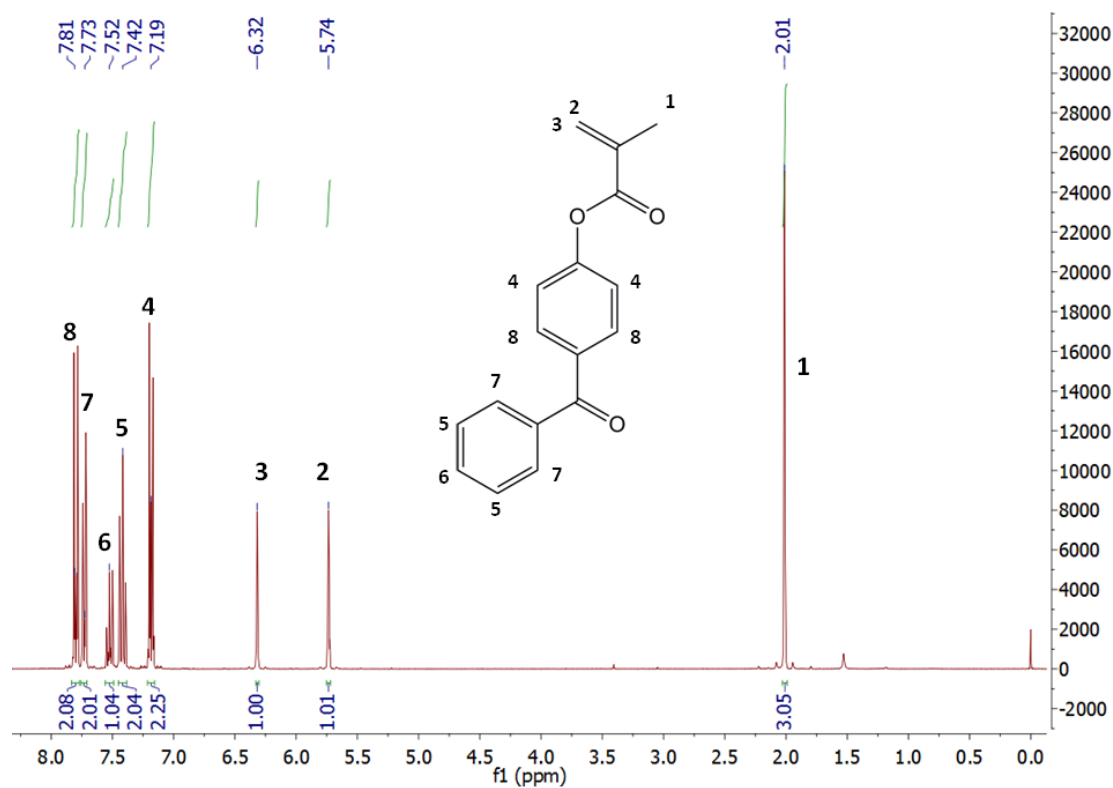
This finding was directly used to control the retention of analytes and thus to **optimize the sensitivity and specificity of μ PADs in the model system with dyes**. A dye mixture of positively charged methylene blue molecules and negatively charged tartrazine molecules could be separated by simple interaction with the negatively charged cellulose fibers. By establishing the lowest possible conductivity of the fluid phase, this **separation of the dye mixture** was optimized (Section 5.2.2). The separation of the analyte mixture enabled a specific analysis of the individual components and thus increased the specificity of the μ PAD.

Furthermore, the **sensitivity of the model- μ PAD was increased**. For this purpose, a polymer with a reactive *N*-hydroxysuccinimide ester group was first bound by means of site-specific photolithography in defined areas of the channel. In a second step, this polymer was heterogeneously reacted with a permanently positively charged amine, resulting in positively charged areas ("patches") in the channel (Section 6.1.2). The negatively charged model dye tartrazine could be specifically retargeted on these patches. The retention based on the electrostatic interaction between the applied positive charge and the negative charge of the dye molecules caused a local concentration increase of the molecules, so that dyes could be detected in previously undetectable concentrations (Section 6.3).

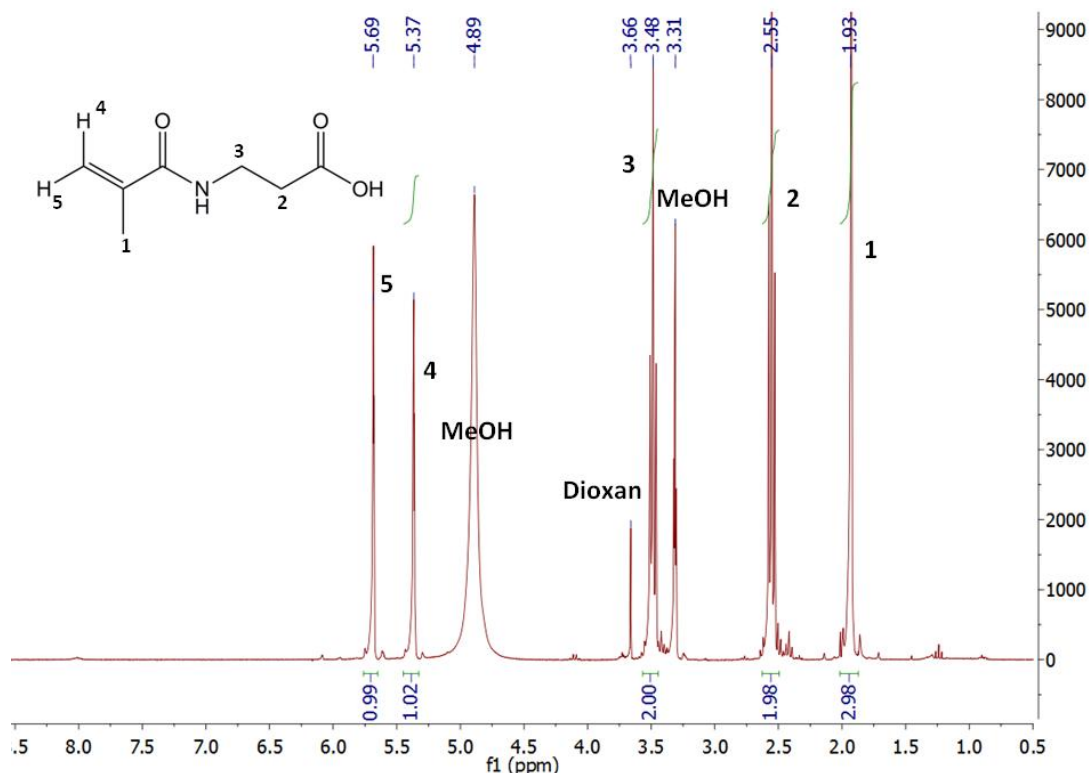
Finally, the results of the investigation was also to be verified for more complex and therefore more application-oriented systems as dye molecules. Therefore, the very stable **protein IL-8 was selected as a model analyte** for further investigations, which was particularly interesting due to a cooperation with the group of Prof. Dr. Schmitz. For detection, it was modified with TAMRA. The protein was first modelled in terms of its charge properties as a function of pH (Section 7.1). A change in the surface charge of the protein from positive to negative could be calculated between pH 9 and pH 11. Subsequently, the influence of pH (Section 7.2.1) on protein retention in paper was investigated. The change in retention correlated directly with the change in the surface charge of the protein, confirming the assumption of a predominantly charge-based interaction that was the result of the dye experiments. Furthermore, the influence of the analyte concentration (Section 7.2.3) on the retention factor was investigated. The explanatory approach of an "overloading effect" based on a limited number of adsorption sites was supported by the results of protein retention. In addition, the unknown concentration of a sample solution could be determined exactly to a power of ten using the retention factor and a calibration line, which also confirmed this explanatory approach. No influence of the buffer (Section 7.2.2) on protein retention was detected, which is beneficial for possible applications of μ PADs, since the buffer type does not have to be taken into account in an analysis. On average, the use of organic solvents as the fluid phase (Section 7.2.4) significantly reduced protein retention in paper. The explanations for this observation could be denaturation, conformational changes of the protein or altered interaction mechanisms caused by changing the polarity of the eluent. This explanatory approaches would have to be confirmed by further experiments, e.g. CD-spectroscopic investigations of protein structure in various organic solvents. Finally, it was investigated to what extent the modification of the substrate material with the protein-repellent polymer polydimethylacrylamide (Section 7.3.1) and bovine serum albumin (BSA) (Section 7.3.2) has an influence on protein retention. It was found that these modifications slightly, but not significantly, affected protein retention.

The diverse and interesting findings of this work **provide a first platform** for the complex topic of controlling the retention of likely future application-relevant analytes, such as proteins, in paper. The central aspect of further research should be paper analysis (Section 4.5). For better characterization of the results, further development of the used techniques (retention experiment e.g. according to Di Risio *et al.*^[176] or Lappalainen *et al.*^[8] and expansion of known analytical techniques (e.g. solid-state NMR) for paper is essential. In addition, an interesting approach would be to avoid electrostatic interactions, the central element of the interactions, e.g. by neutralizing the fiber-inherent negative charge. This could potentially extend the application spectrum of paper as substrate material for μ PADs. It would be particularly interesting to be able to control the retention of proteins. Based on the principle of affinity chromatography, the site-specific immobilization of ligands (e.g. antigen) in paper would be conceivable.

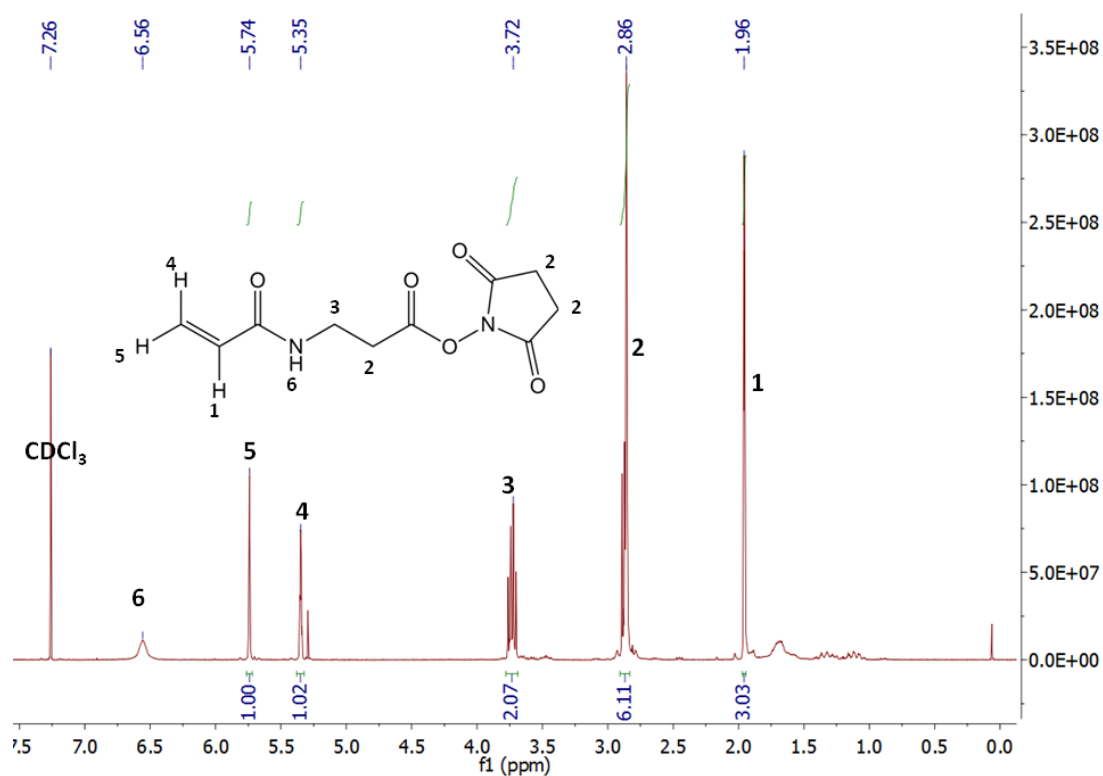
1. NMR-Spektren



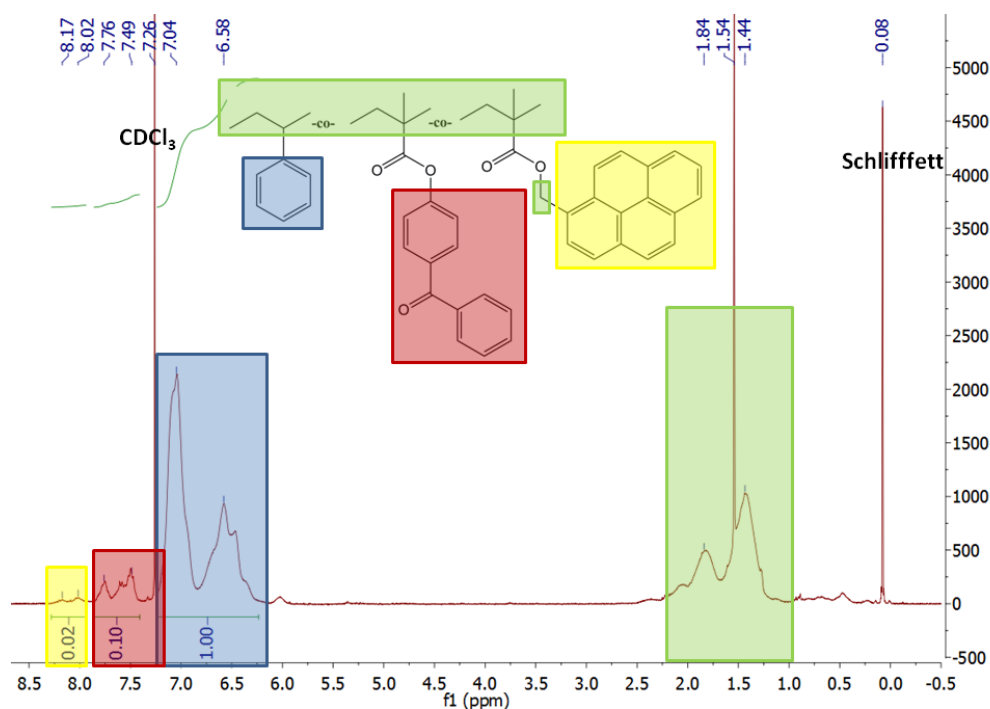
^1H -NMR von 4-Methylacryloyloxybenzophenon in CDCl_3 . δ in ppm: 2,01 (dd, 3H, CH_3 (Allyl)), 5,74 (dd, 1H, CH (Olefin)), 6,32 (dd, 1H, CH (Olefin)), 7,19 (m, 2H, CH (aromatisch) Überlagerung mit Lösungsmittelsignal), 7,42 (m, 2H, CH (aromatisch)), 7,52 (m, 1H, CH (aromatisch)), 7,73 (m, 2H, CH (aromatisch)), 7,81 (m, 2H, CH (aromatisch)).



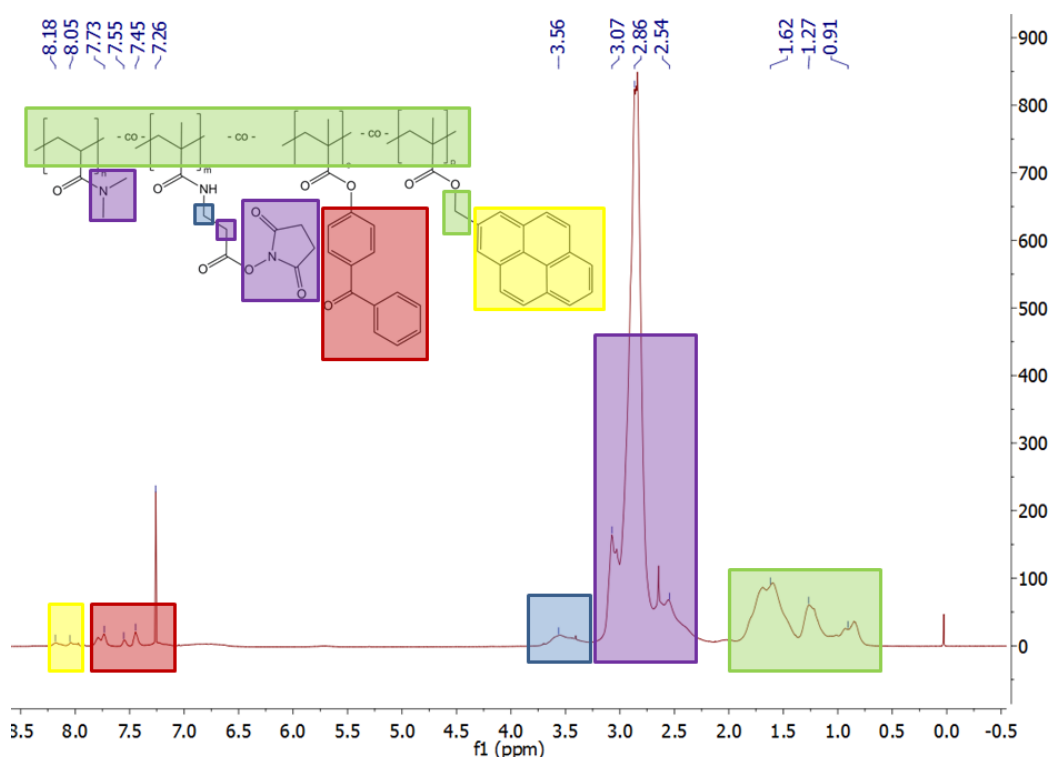
¹H-NMR von des Rohprodukts *N*-Methylacryloyl- β -alanin in MeOD. δ in ppm: 1,93 (dd, 3H, CH₃ (Allyl)), 2,55 (t, 2H, CH₂ (benachbart Carboxyl)), 3,31 (Lösungsmittelsignal), 3,480 (t, 2H, CH₂ (benachbart Amid)), 3,66 (Dioxan), 4,89 (Lösungsmittelsignal), 5,37 (dd, CH (Olefin)), 5,69 (dd, 1H, CH (Olefin)).



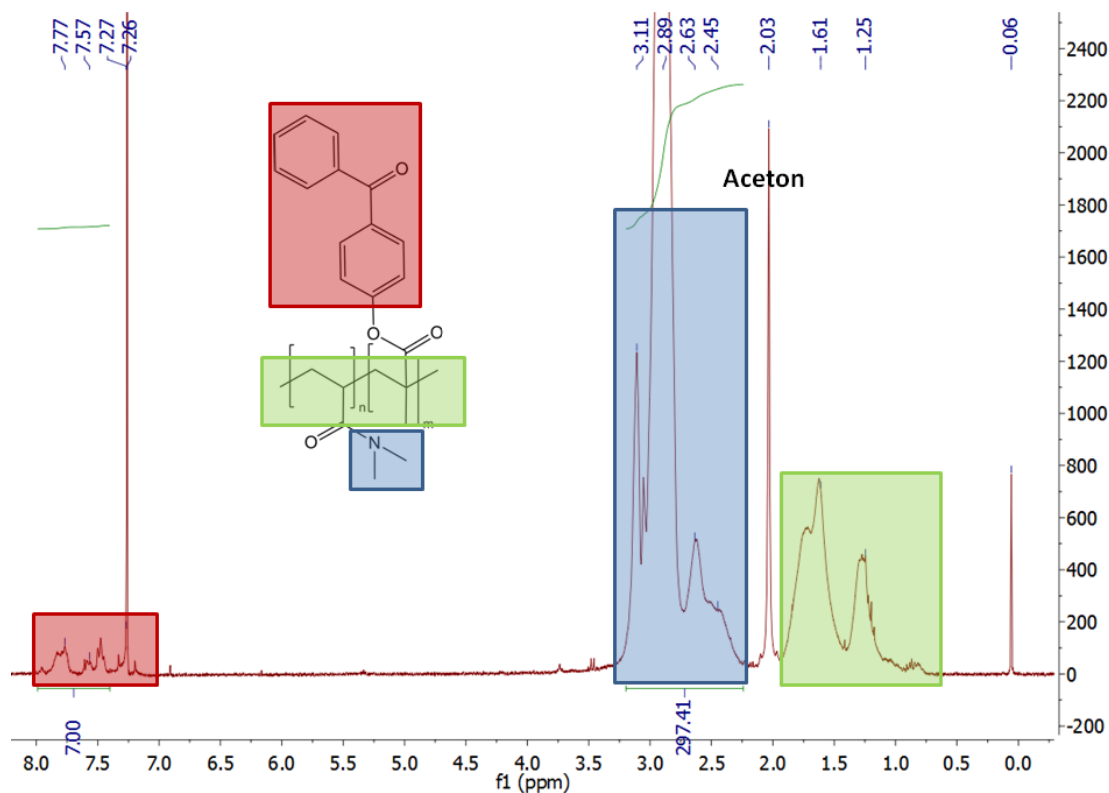
¹H-NMR von *N*-Methylacryloyl- β -alanin succinimid ester in CDCl₃. δ in ppm: 1,96 (dd, 3H, CH₃ (Allyl)), 2,86 (m, 6H, CH₂ (Succinimid/benachbart Ester)), 3,72 (m, 2H, CH₂ (benachbart Amid)), 5,35 (dd, 1H, CH (Olefin)), 5,74 (dd, 1H, CH (Olefin)), 6,56 (s (breit), 1H, NH (Amid)), 7,26 (Lösungsmittelsignal).



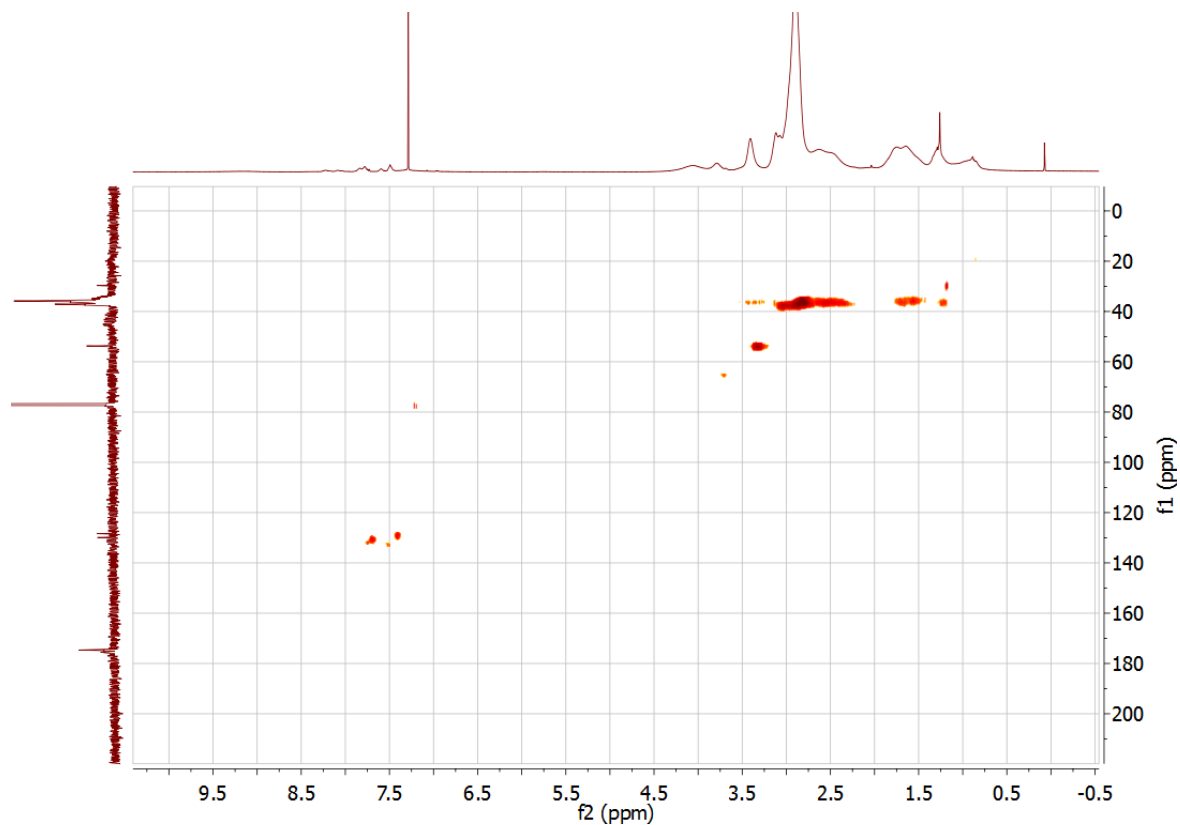
$^1\text{H-NMR}$ von $\text{P}(\text{S-co-MABP-co-PyMA})$ in CDCl_3 . δ in ppm: 0,08 (Schliff Fett), 1,26–2,12 (CH_2 des Polymerrückgrats und CH_3 der MABP- und PyMA-Einheiten), 6,24–7,24 (5H des aromatischen Systems von Styrol überlagert mit 2Hs des aromatischen Systems von MABP), 7,26 (Lösungsmittelsignal), 7,41–7,86 (7H des aromatischen Systems von MABP) 7,94–8,24 (9H des aromatischen Systems von PyMA).



$^1\text{H-NMR}$ von $\text{P}(\text{DMAA-co-MAC}_2\text{AE-co-MABP-co-PyMA})$ in CDCl_3 . δ in ppm: 0,78–1,86 (CH_2 des Polymerrückgrats und CH_3 der MAC_2AE -, MABP- und PyMA-Einheiten), 2,29–3,15 (CH_3 am tert. Amid der DMAA-Matrix, CH_2 benachbart zur Amidgruppe und im Succinimid in MAC_2AE), 3,27–3,72 (CH_2 benachbart zur Estergruppe in MAC_2AE), 7,26 (2H des aromatischen Systems von MABP überlagern mit Lösungsmittelsignal), 7,38–7,84 (7H des aromatischen Systems von MABP), 7,90–8,22 (9H des aromatischen Systems von PyMA).



^1H -NMR von P(DMAA-*co*-MABP) in CDCl_3 . δ in ppm: 0,06 (Schliff fett), 0,75–1,93 (CH_2 des Polymerrückgrats und CH_3 der MABP-Einheit), 2,03 (Aceton), 2,24–3,19 (6H, CH_3 tert. Amid), 7,26 (2H des aromatischen Systems von MABP überlagern mit Lösungsmittelsignal), 7,40–7,99 (7H des aromatischen Systems von MABP).



HSQC-Spektrum von P(DMAA-*co*-AEMAC-*co*-MABP-*co*-PyMA) in CDCl_3 . Es ist deutlich eine Kopplung zwischen den Wasserstoffatomen bei 3,4 ppm und den Kohlenstoffatomen bei 54 ppm zu erkennen, die den Methylgruppen der quartären Amingruppe des AEMACs zugeordnet werden können.

2. PTS-Prüfbericht zur Quecksilberporosimetriemessung



PTS-PRÜFBERICHT 280616 v2

Auftraggeber	TU Darmstadt Makromolekulare Chemie und Papierchemie – AK Biesalski z.Hd. Sonja Wendenburg Alarich-Weiss-Straße 8 64293 Darmstadt
Mustereingang	06.05.2016
Bearbeitung	S. Lupatsch PTS Pirnaer Str. 37 01809 Heidenau Tel. 03529/551-631

Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die untersuchten Proben. Ohne schriftliche Genehmigung der Papiertechnischen Stiftung dürfen diese Ergebnisse nicht veröffentlicht werden, nicht in einem Rechtsstreit verwendet und nicht auszugsweise vervielfältigt werden.

Heidenau, den 28.06.2016

M. Haft
Projektleiter D&O

S. Lupatsch
Laborant D&O

PTS-Prüfbericht

Seite 1/10

1 Mustermaterial

Mustermaterial Vom Auftraggeber wurden folgende Muster zur Prüfung überlassen:

- 1 - Linters 27
- 2 - Linters 45
- 3 - Linters 76
- 4 - Linters 84
- 5 - Linters 160
- 6 - Eukalyptus 27
- 7 - Eukalyptus 45
- 8 - Eukalyptus 76
- 9 - Eukalyptus 84
- 10 - Eukalyptus 160
- 11 - Roth 15 A

2 Aufgabenstellung

Aufgabe Es war mittels Quecksilberporosimetrie die Porengröße und deren Bereichs porosität zu untersuchen und mglw. Aussagen zur Verteilung der Poren zu treffen.

3 Durchführung

Durchführung Es wurde für die Untersuchungen ein Quecksilberporosimeter PoreMaster 60 GT der Fa. Quantachrome eingesetzt. Die Kapillare mit der Probe wird im Gerät evakuiert und mit elementarem Quecksilber beaufschlagt. Durch die hohe Oberflächenspannung des Quecksilbers werden kleine Hohlräume und Poren dabei nicht gefüllt (Kapillardepression). Erst bei Anlegen eines äußeren Drucks füllen sich zunächst große und mit steigendem Druck immer kleinere Poren. Diese Prozedur wird erst in einer Niederdruck- und anschließend in einer Hochdruckkammer umgesetzt. Das in die Probe penetrierte Quecksilbervolumen wird kontinuierlich gemessen und man erhält typische Penetrationskurven. Bei Annahme von zylinderförmigen Proben kann der hydrostatische Druck direkt in einen äquivalenten Porenradius bzw. -durchmesser umgerechnet werden.

Pro Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei es dem Anwender offen stand, im Zweifelsfall auch Wiederholungsmessungen durchzuführen.

Vorbereitend zur Auswertung hat die PTS evtl. noch fehlende Eckdaten wie Flächengewichte und Dicken der Proben bestimmt und verwendet.

4 Probenvorbehandlung

Probenvorbehandlung Es wurden jeweils 8 gleich große Streifen (ca. 0,5-1g) der zu untersuchenden Proben angefertigt und in eine spezielle Kapillare gefüllt.

5 Ergebnisse

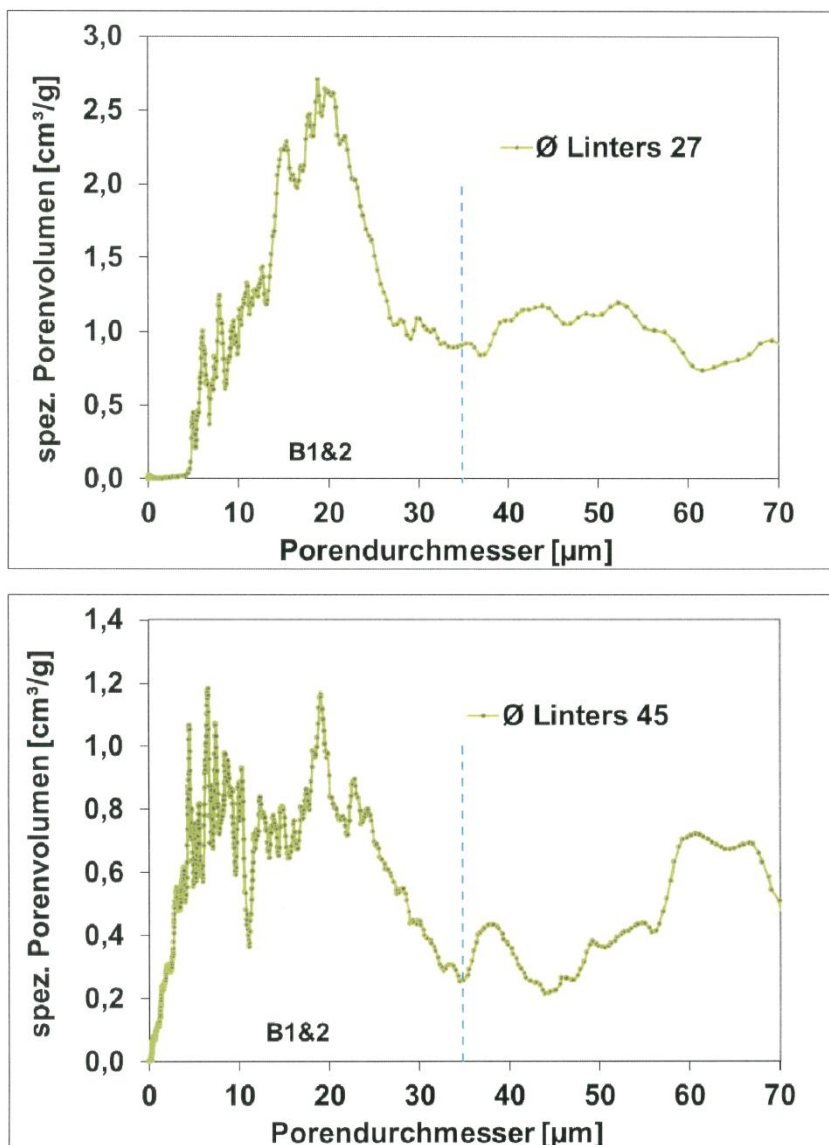
Zusammenfas- sung	Nr.	Probe	Porosität [%]	Mittlerer Porenradius [μm]	Mittlerer Porendurch- messer [μm]	Porenvolumen [mL/g]
Bereich 1&2 (d=0-35μm)						
	1	Linters 27	30,4	7,29	14,58	0,69
	2	Linters 45	30,8	5,15	10,30	0,58
	3	Linters 76	37,5	4,83	9,66	0,69
	4	Linters 84	27,8	4,77	9,54	0,49
	5	Linters 160	32,3	3,30	6,59	0,57
	6	Eukalyptus 27	41,0	5,89	11,77	0,83
	7	Eukalyptus 45	44,6	5,32	10,65	0,86
	8	Eukalyptus 76	47,1	4,40	8,80	0,84
	9	Eukalyptus 84	48,5	4,44	8,87	0,88
	10	Eukalyptus 160	46,0	3,78	7,57	0,81
	11	Roth 15 A	28,9	2,69	5,38	0,48
Bemerkung	Die Ergebnisse für die Bereichsporositäten aus dem <i>Prüfbericht 240516</i> sind auf Grund fehlerhafter Softwarealgorithmen falsch!!! Bitte nur die Werte für den oben definierten Bereich heranziehen!					

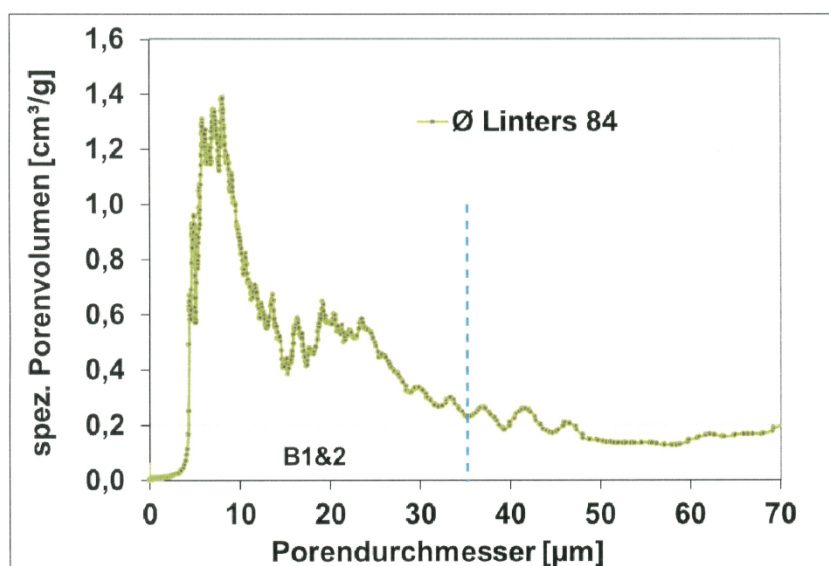
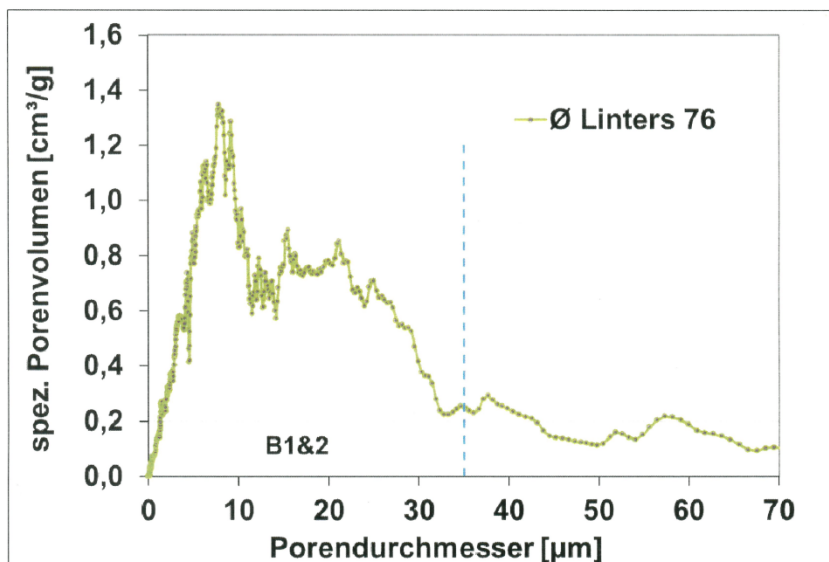
6 Fazit

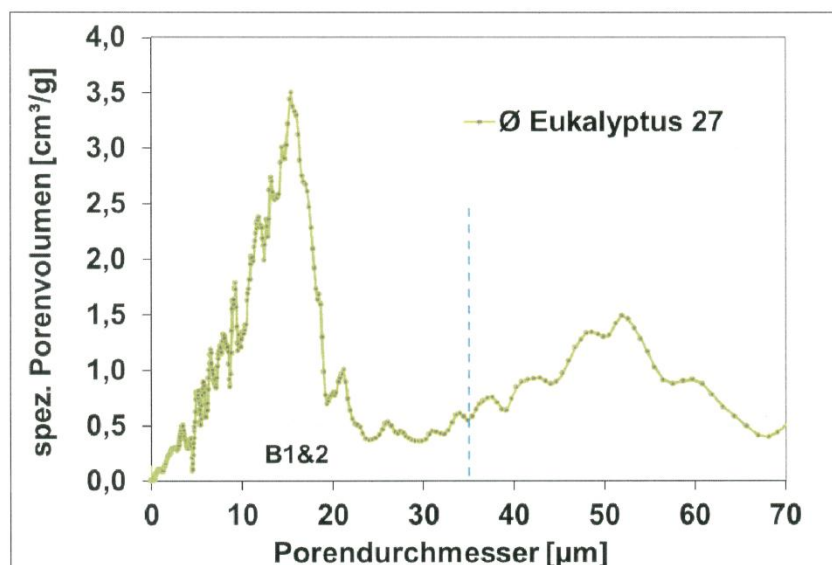
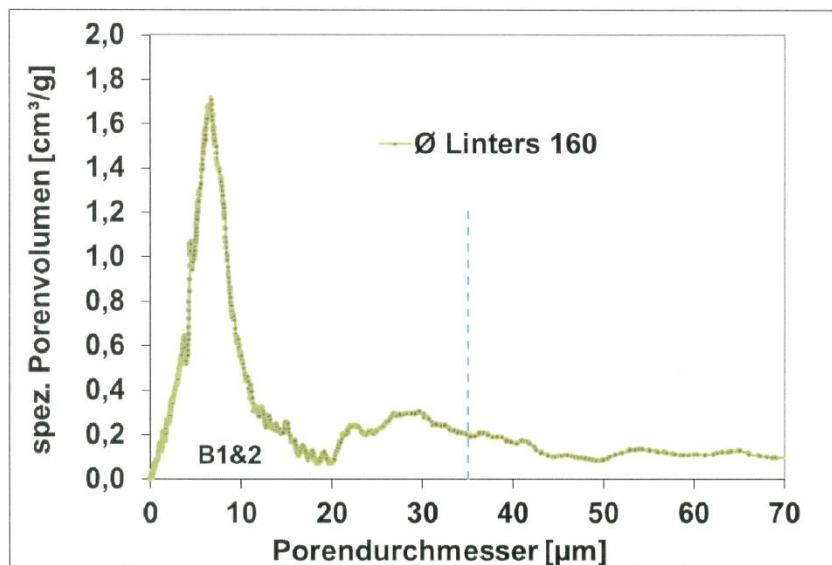
- Messergebnisse** Bei den Proben konnte jeweils nur ein Gesamtbereich ermittelt werden. Dieser Bereich wurde vom Kunden vorgeschlagen. Er liegt zwischen 0 und 35µm Porendurchmesser und wird beziehend auf den *Prüfbericht 240516 „B1&2“* genannt.
- Alle 11 Proben weisen ausschließlich Poren, oder besser gesagt Hohlräume, im Makroporenbereich (>50nm) auf.
- Anhand der Daten kann differenziert festgestellt werden:
- Bei den Linters- wie auch Eukalyptusproben ist für die **Porosität** keine Tendenz in Abhängigkeit zum Flächengewicht erkennbar.
 - Bei vergleichbarem Flächengewicht, ist die **Porosität** im definierten Bereich bei den Eukalyptusproben höher als bei den Linters-Proben.
 - Der **mittl. Porendurchmesser** nimmt im definierten Bereich sowohl bei den Linters- wie auch bei den Eukalyptusproben mit steigendem Flächengewicht tendenziell ab.
 - Bei vergleichbarem Flächengewicht, ist der **mittl. Porendurchmesser** im definierten Bereich bei den Eukalyptusproben kleiner als bei den Linters-Proben.
 - Bei den Linters- wie auch Eukalyptusproben ist für das **Porenvolumen** keine Tendenz in Abhängigkeit zum Flächengewicht erkennbar.
 - Bei vergleichbarem Flächengewicht, ist das **Porenvolumen** im definierten Bereich bei den Eukalyptusproben höher als bei den Linters-Proben.
 - Die Probe Roth 15A weist im Vergleich zu den Proben Linters 84 und Eukalyptus 84 (ähnliche Flächengewichte) einen kleineren Porendurchmesser und ein kleineres Porenvolumen auf. Von der Porosität her, ist die Probe Roth 15A am ehesten mit der Probe Linters 84 vergleichbar.

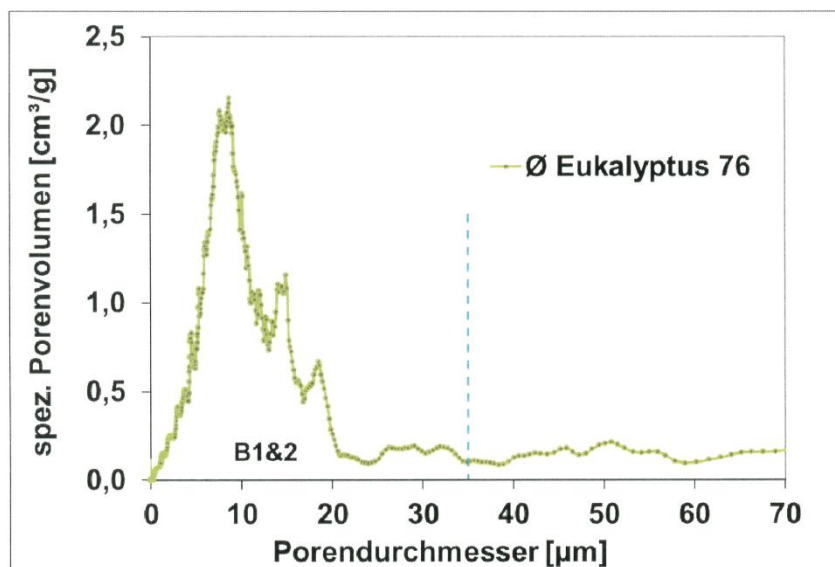
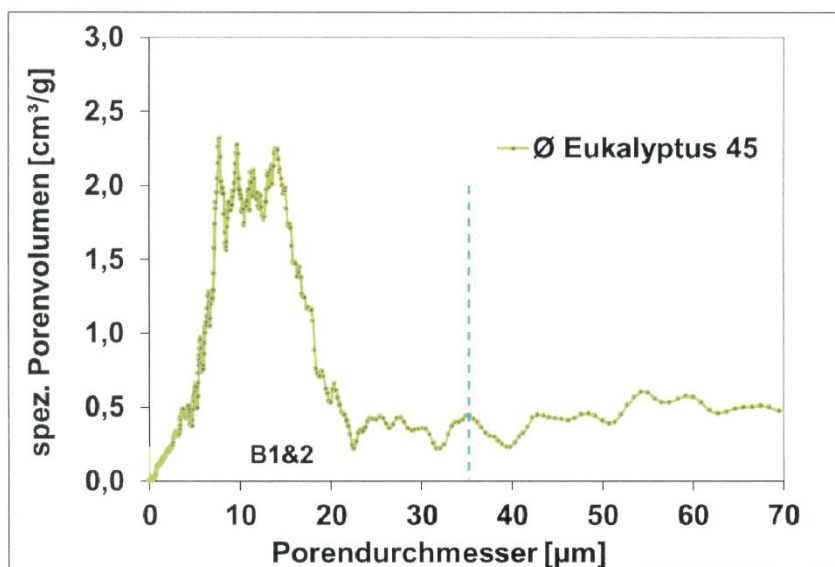
7 Anhang

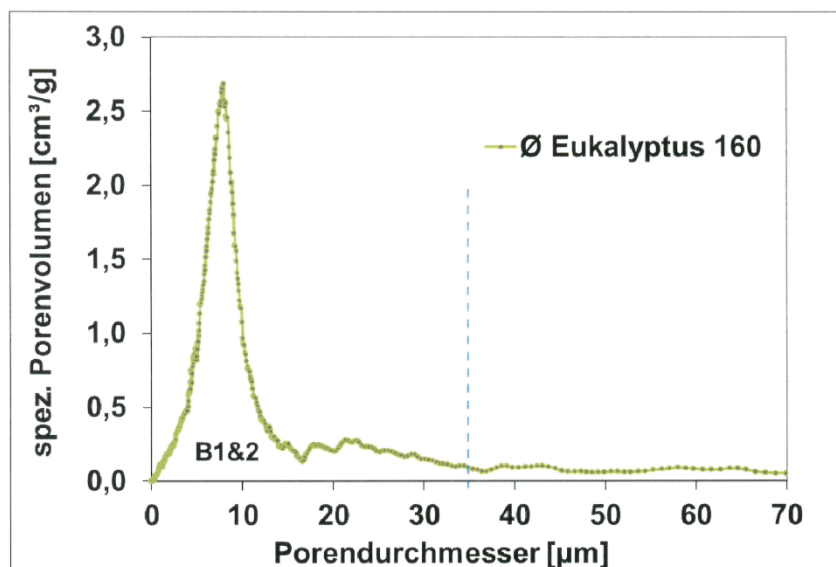
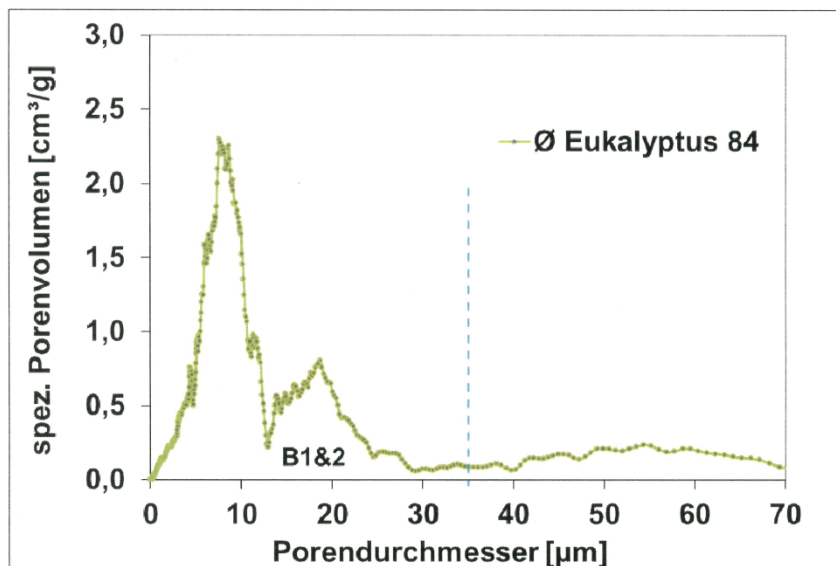
Folgend sind die gemittelten Gesamtporenverteilungen inkl. Bereichsdifferenzierung der 11 gemessenen Proben veranschaulicht. Die Diagramme beziehen sich nur auf die ermittelten Rohdaten!

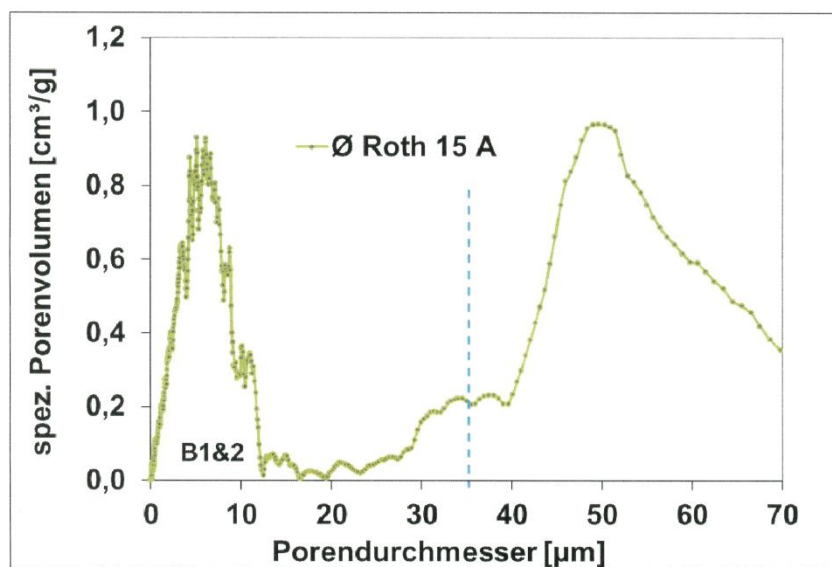














Sonja Wendenburg
Parcusstraße 8
64293 Darmstadt

25. November 2017

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Sonja Wendenburg

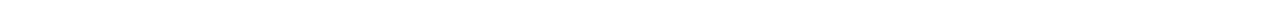
Sonja Wendenburg
Parcusstraße 8
64293 Darmstadt

25. November 2017

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Sonja Wendenburg



LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 29.10.1987
Geburtsort: Dieburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig



Ausbildung

seit 06/2013

Promotion am Fachbereich Chemie der TU Darmstadt

Angestrebter Abschluss: Doctor rerum naturalium
Thema der Promotion in der Makromolekulare Chemie und Papierchemie bei Prof. Dr. M. Biesalski:
„Analyse und Steuerung des Retentionsverhaltens verschiedener Modellanalyte in mikrostrukturierten Papieren“

04/2013

Abschluss: Master of Science in Chemie (1,3) an der TU Darmstadt

Thema der Masterthesis in der Biochemie bei Prof. Dr. H. Kolmar:
„Dirhodium Metallopeptides for Site-specific Labeling of Biomacromolecules“

10/2011 – 04/2013

Aufbaustudium an der Technischen Universität Darmstadt in Biochemie, Makromolekularer Chemie und Physikalischer Chemie

09/2010 – 07/2011

Erasmusaufenthalt an der École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Schweiz

09/2010

Abschluss: Bachelor of Science in Chemie (1,8) an der TU Darmstadt

Thema der Bachelorthesis in der Biochemie bei Prof. Dr. N. Dencher:
„Aufbau einer Methode zur Messung der ATP-Konzentration mit Hilfe von Lumineszenz“

10/2008 – 09/2010

Chemiestudium, Technische Universität Darmstadt

10/2007 – 09/2008

Chemiestudium, Julius-Maximilian-Universität, Würzburg

06/2007

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,0)

Bertolt-Brecht-Schule, Oberstufengymnasium, Darmstadt

Arbeitserfahrung

seit 03/2017

KIVA-Koordinatorin am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt

Darmstadt, den 25.11.2017
